

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

**Charakterisierung der Hypoxie-induzierten
Transkriptionsfaktoren AtLBD41 und AtERF#111/ABR1
aus *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Judith Bäuml

geboren am 24.07.1989 in Lauf an der Pegnitz

Bayreuth, Februar 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2015 bis Februar 2020 in Bayreuth am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie in der Arbeitsgruppe Pflanzengenetik unter der Betreuung von Professorin 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 einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 04.02.2020

Zulassung durch die Promotionskommission: 12.02.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 28.07.2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Matthias Breuning

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Angelika Mustroph (Gutachterin)

Prof. Dr. Stephan Clemens (Gutachter)

Prof. Dr. Gerrit Begemann (Vorsitz)

Prof. Dr. Klaus Ersfeld

Teile dieser Arbeit wurden in dem Artikel

„AtERF#111/ABR1 is a transcriptional activator involved in the wounding response”

Bäumler, J., Riber, W., Klecker, M., Müller, L., Dissmeyer, N., Weig, A.R., and Mustroph, A. (2019). The
Plant Journal 100 (5): 969-990

veröffentlicht.

*Diese Arbeit ist all jenen Menschen gewidmet,
die aufgrund von Krieg, Vertreibung oder struktureller Benachteiligung
das Privileg einer umfassenden Bildung nicht genießen.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Summary	VIII
Zusammenfassung.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Pflanzen benötigen Sauerstoff zum Überleben	1
1.2 Anpassungsstrategien von Pflanzen bei Überflutung und Sauerstoffmangel.....	2
1.2.1 Morphologische Anpassungen	3
1.2.2 Metabolische Anpassungen	4
1.3 Der <i>Arg/N-degron pathway</i> als Sauerstoffsensor in Pflanzen	6
1.4 GVIIFs in Reis als Regulatoren der <i>Quiescence</i> - und <i>Escape</i> -Strategie	8
1.5 Identifikation einer konservierten Hypoxieantwort.....	9
1.6 Der Transkriptionsfaktor AtLBD41	10
1.6.1 Die LBD-Genfamilie.....	10
1.6.2 AtLBD41 bei Sauerstoffmangel.....	11
1.6.3 AtLBD41 als putativer Repressor der Transkription	12
1.6.4 AtLBD41 als mögliches SUMO-Substrat	12
1.7 Weitere Substrate des <i>Arg/N-degron pathways</i> in Pflanzen	13
1.8 ABA-Signalgebung und Verbindung zum <i>Arg/N-degron pathway</i>	14
1.9 Der Transkriptionsfaktor ABR1/ATERF#111	15
1.10 Zielsetzung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien und Reagenzien	17
2.2 Bakterienstämme	17
2.3 Bezogenes Pflanzenmaterial	17
2.4 Bedingungen für die Pflanzenanzucht.....	17
2.5 Verwendete Antibiotika	18
2.6 Molekularbiologische Standardmethoden.....	18
2.6.1 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzengewebe	18
2.6.2 Isolation von RNA und reverse Transkription in cDNA.....	19
2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
2.6.4 Agarosegelelektrophorese	21
2.6.5 DNA-Restriktionsverdau und Aufreinigung	21
2.6.6 Ligation	21
2.6.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	21
2.6.8 Transformation von <i>E. coli</i>	22

2.6.9	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
2.6.10	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	22
2.6.11	Transiente Tabak-Transformation mit <i>A. tumefaciens</i>	23
2.6.12	Transformation von Arabidopsis durch <i>floral dip</i>	23
2.6.13	Kreuzung von Arabidopsis Genotypen	24
2.7	Verwendete Plasmide und Klonierungen.....	24
2.7.1	<i>Gateway</i> -Klonierung und Generierung von <i>Gateway</i> -Entry Vektoren	24
2.7.2	Plasmide zur transienten Expression in Protoplasten.....	24
2.7.3	Plasmide zur transienten Expression in <i>N. benthamiana</i> oder stabilen Expression in <i>A. thaliana</i>	25
2.7.4	Generierung von Mutationen mittels CRISPR/Ca9.....	26
2.8	Versuche mit Arabidopsis Protoplasten.....	26
2.8.1	Protoplastenisolation	26
2.8.2	Protoplastentransformation und Behandlung mit CHX, DEX und MG132.....	27
2.8.3	Proteinextraktion aus Protoplasten	27
2.8.4	Quantitative Luciferasemessung	28
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.9.1	Proteinextraktion aus Keimlingen	28
2.9.2	Proteinextraktion aus Tabak und Chromatin-Immunopräzipitation.....	28
2.9.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot.....	29
2.10	Stressbehandlungen	30
2.10.1	Hypoxie-Stress mit anschließender Transkriptanalyse	30
2.10.2	Hypoxie-Überlebensexperimente mit Keimlingen	30
2.10.3	Überflutungsexperimente mit adulten Pflanzen.....	31
2.10.4	ABA-Experimente	31
2.10.5	Verwundungs- und Trockenstress.....	32
2.10.6	H ₂ O ₂ , MeJA und ACC-Behandlung	32
2.11	Mikroarrayanalysen.....	32
2.12	<i>Gene-Ontology</i> Analysen.....	33
2.13	Mikrotomschnitte und Analyse des Wurzelhaarphänotyps.....	33
2.14	Konfokale Mikroskopie.....	34
2.15	Qualitative Biolumineszenzmessung.....	34
2.16	Statistische Auswertung.....	34
2.17	DNA Sequenzierung.....	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Charakterisierung des Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktors AtERF#111	35
3.1.1	Die Expression von <i>AtERF#111</i> wird durch Hypoxie und Überflutung induziert	35

3.1.2	AtERF#111 ist kein Substrat des <i>Arg/N-degron pathways</i> , unterliegt jedoch trotzdem einer Ubiquitin-abhängigen Degradation.....	38
3.1.3	AtERF#111 ist kein Repressor der ABA-Antwort	41
3.1.4	<i>AtERF111</i> wird nicht durch Trockenstress, sondern durch Verwundung induziert	45
3.1.5	Analyse der Expression von <i>AtERF#111</i> unter weiteren Stressbedingungen	48
3.1.6	<i>ERF#111</i> -OE Linien zeigen eine veränderte Wurzel- und Sprossentwicklung.....	49
3.1.7	Erstellung von Genexpressionsprofilen von <i>ERF#111</i> -Überexpressionslinien	51
3.1.8	Identifikation von direkten <i>AtERF#111</i> -Zielgenen	54
3.1.9	AtERF#111 transaktiviert die Promotoren ausgewählter Zielgene	57
3.2	Charakterisierung des Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktors AtLBD41.....	60
3.2.1	Analyse der Expression von <i>AtLBD41</i> bei Überflutung.....	60
3.2.2	AtLBD41 agiert als Repressor	61
3.2.3	Identifikation putativer Zielgene von AtLBD41	62
3.2.4	AtLBD41 agiert womöglich redundant mit AtLBD40 und AtLBD42.....	65
3.2.5	AtLBD41 und seine homologen AtLBD40 und AtLBD42 können die Promotoren der Zielgene regulieren.....	66
3.2.6	LBD41 aus <i>Oryza sativa</i>	70
3.2.7	Generierung und Analyse einer <i>Ibd40/41/42</i> Dreifachmutante	73
3.2.8	Analyse von stabilen <i>LBD41</i> -Überexpressionslinien	76
3.2.9	AtLBD41 wird posttranslational durch SUMOylierung modifiziert	78
4	Diskussion	81
4.1	Der Transkriptionsfaktor AtERF#111.....	81
4.1.1	AtERF#111 wird durch das Ubiquitin/Proteasom System abgebaut.....	81
4.1.2	AtERF#111 ist ein Aktivator der Genexpression und steht nicht in Verbindung zur ABA-Signalgebung oder Trockenstress.....	83
4.1.3	AtERF#111 ist in die Verwundungsantwort involviert	86
4.1.4	Steht die Induktion von AtERF#111 in Verbindung zu mechanischem Stress bei Überflutung?	89
4.2	Der Transkriptionsfaktor AtLBD41	91
4.2.1	AtLBD41 als Repressor der Transkription bei Sauerstoffmangel	91
4.2.2	Ermöglicht AtLBD41 eine Rückkehr zur zellulären Homöostase nach Überflutung?	93
4.2.3	AtLBD41 reguliert seine Zielgene redundant mit AtLBD40 und AtLBD42	96
4.2.4	AtLBD41 wird SUMOyliert	98
4.3	Fazit und Ausblick.....	100
5	Literaturverzeichnis	101
6	Anhang.....	124

Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
Ala	Alanin
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AOX	Alternative Oxidase
AP2	APETALA2
ATP	Adenosintriphosphat
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Cas	CRISPR-associated
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHX	Cykloheximid
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Col-0	Columbia
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
Cys	Cystein
DEG	differentiell exprimiertes Gen
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EAR	<i>ERF-associated amphiphilic repression</i>
ERF	<i>Ethylene Responsive Factor</i>
fLUC	Firefly Luciferase
GA	Gibberellinsäure
gDNA	genomische DNA
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GO	<i>Gene Ontology</i>
GVIIFERF	<i>Group VII Ethylene Response Factor</i>
GXERF	<i>Group X Ethylene Response Factor</i>
HA	Hämagglutinin
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>

His	Histidin
HRG	Hypoxie-responsives Gen
HRPE	Hypoxie-responsives Promotorelement
KT	Kurztag
LOB	<i>Lateral Organ Boundaries</i>
LT	Langtag
LUC	Luciferase
Met	Methionin
MC	Met-Cys
MS	Murashige und Skoog
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
OE	Überexpression (<i>over expression</i>)
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	Wiederbelüftung (<i>reaeration</i>)
rLUC	Renilla Luciferase
RNA-Seq	RNA-Sequenzierng
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RTL	Relatives Transkriptlevel
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RT-qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
SLR	<i>Signal-Log2-Ratio</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TF	Transkriptionsfaktor
UTR	untranslatierte Region
Ub	Ubiquitin
WT	Wildtyp

Liste der verwendeten Gene aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*, welche in der Arbeit entweder mindestens drei Mal erwähnt oder experimentell adressiert wurden.

Abkürzung	Genname	Nomenklatur
<i>A. thaliana</i>		
AOX1D	ALTERNATIVE OXIDASE 1D	AT1G32350
ATE1	ARGININE-TRNA PROTEINTRANSFERASE 1	AT5G05700
ATE2	ARGININE-TRNA PROTEINTRANSFERASE 2	AT3G11240
CYP71B22	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 22	AT3G26200
CYP71B28	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 28	AT1G13090
EF1A	Elongationsfaktor 1-alpha	AT5G60390
ERF#108/RAP2.6	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 108/ RELATED TO AP2 6	AT1G43160
ERF#109/RRTF1	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 109/ REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1	AT4G34410
ERF#110	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 110	AT5G50080
ERF#111	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 111/ ABA REPRESSOR 1	AT5G64750
ERF#112	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 112	AT2G33710
ERF#113/ RAP2.6L	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 113/ RELATED TO AP2 6L	AT5G13330
ERF#114	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 114	AT5G61890
ERF#115	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115	AT5G07310
ESD4	EARLY IN SHORT DAYS4	AT4G15880
EXPA1	EXPANSIN A1	AT1G69530
GGT4	GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE 4	AT1G69820
HRA1	HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR1	AT3G10040
HRE1	HYPOXIA RESPONSIVE ERF1	AT1G72360
HRE2	HYPOXIA RESPONSIVE ERF2	AT2G47520
LBD37	LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 37	AT5G67420
LBD38	LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 38	AT3G49940
LBD39	LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 39	AT4G37540
LBD40	LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 40	AT1G67100
LBD41	LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 41	AT3G02550
LBD42	LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 42	AT1G68510
PAP1	PRODUCTION OF ATHOCYANIN PIGMENT 1	AT1G56650
PDF1.2a	PLANT DEFENSIN 1.2a	AT5G44420
PDF1.2b	PLANT DEFENSIN 1.2b	AT2G26020
PDF1.2c	PLANT DEFENSIN 1.2c	AT5G44430
PDF1.3	PLANT DEFENSIN 1.3	AT2G26010
PGDH	3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE	AT1G17745
PRT6	PROTEOLYSIS 6	AT5G02310
PUP10	PURINE PERMEASE 10	AT4G18210
RAB18	RESPONSIVE TO ABA 18	AT5G66400
RAP2.2	RELATED TO AP2 2	AT3G14230

<i>RAP2.3</i>	<i>RELATED TO AP2 3</i>	<i>AT3G16770</i>
<i>RAP2.12</i>	<i>RELATED TO AP2 12</i>	<i>AT1G53910</i>
<i>RD22</i>	<i>RESPONSIVE TO DESICCATION 22</i>	<i>AT5G25610</i>
<i>RHODANESE</i>	<i>RHODANESE</i>	<i>AT2G17850</i>
<i>SUMO1</i>	<i>SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER 1</i>	<i>AT4G26840</i>
<i>SUMO2</i>	<i>SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER 2</i>	<i>AT5G55160</i>
<i>SUMO3</i>	<i>SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER 3</i>	<i>AT5G55170</i>
<i>SCE1</i>	<i>SUMO CONJUGATING ENZYME 1</i>	<i>AT3G57870</i>
<i>SS3</i>	<i>Strictosidine synthase 3</i>	<i>AT1G74000</i>
<i>TH8</i>	<i>Thioredoxin H-type 8</i>	<i>AT1G69880</i>
<i>TPL</i>	<i>TOPLESS</i>	<i>AT1G15750</i>
<i>TUB2</i>	<i>TUBULIN BETA CHAIN 2</i>	<i>AT5G62690</i>
<i>VRN2</i>	<i>VERNALISATION 2</i>	<i>AT4G16845</i>
<i>WRKY18</i>	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 18</i>	<i>AT4G31800</i>
<i>WRKY22</i>	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 22</i>	<i>AT4G01250</i>
<i>WRKY33</i>	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 33</i>	<i>AT2G38470</i>
<i>WRKY40</i>	<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 40</i>	<i>AT1G80840</i>
<i>ZPR2</i>	<i>LITTLE ZIPPER 2</i>	<i>AT3G60890</i>
<i>O. sativa</i>		
<i>OsERF66</i>	<i>ETHYLENE RESPONSE FACTOR 66</i>	<i>LOC_OS03G22170</i>
<i>OsERF67</i>	<i>ETHYLENE RESPONSE FACTOR 67</i>	<i>LOC_OS07G47790</i>
<i>OsLBD40</i>	<i>LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 40</i>	<i>LOC_OS01G32770</i>
<i>OsLBD41</i>	<i>LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 41</i>	<i>LOC_OS01G03890</i>
<i>OsGGT4</i>	<i>GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE 4</i>	<i>LOC_OS04G38450</i>
<i>OsPGDH</i>	<i>3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE</i>	<i>LOC_OS08G34720</i>
<i>OsPUP1.1</i>	<i>PURINE PURMEASE 1.1</i>	<i>LOC_OS04G49757</i>
<i>OsPUP3.1</i>	<i>PURINE PURMEASE 3.1</i>	<i>LOC_OS03G08880</i>
<i>OsPUP3.2</i>	<i>PURINE PURMEASE 3.1</i>	<i>LOC_OS09G29239</i>
<i>OsSUB1-A1</i>	<i>SUBMERGENCE1-A1</i>	<i>DQ011598</i>

Summary

As all aerobic organisms, plants rely on the supply of oxygen as a substrate for energy production through oxidative phosphorylation. Most commonly, oxygen deprivation in plants is triggered by submergence due to the extremely low diffusion rate of gases in water in comparison to air. To counteract hypoxic conditions, plants rely on rapid and transient reprogramming of gene expression in order to introduce metabolic as well as morphological adaptations. This work aimed at the characterization of the hypoxia-responsive transcription factors *AtERF#111/ABSCISIC ACID REPRESSOR 1 (ABR1)* and *LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 41 (AtLBD41)* of *Arabidopsis thaliana*, especially in relation to oxygen deficiency.

AtERF#111/ABR1 belongs to the group X of the ERF/AP2 transcription factor family (GXERFs) and is shoot specifically induced under submergence and hypoxia. Loss-of-function of *AtERF#111* in *erf#111-2* as well as stable overexpression (OE) in *ERF#111*-OE lines had no impact on plant survival after submergence. As the N-terminus of *AtERF#111* initiates with the amino acids methionine and cysteine, the protein was analyzed as potential substrate of the Arg/N-degron pathway. The protein stability of (MA)*AtERF#111*, in which the highly conserved N-terminal cysteine residue was replaced by an alanine residue, showed no difference to the native (MC)*AtERF#111* version. Therefore, *AtERF#111* could not be assigned as a target of the Arg/N-degron pathway and gets degraded independently of its N-terminus. An inhibition of the proteasome led to the accumulation of *AtERF#111* protein. Hence, *AtERF#111* is still degraded by the ubiquitin/proteasome system.

AtERF#111 was previously described to be an abscisic acid (ABA)-response repressor, since *erf#111* mutant lines showed a hypersensitive ABA-response in comparison to the wildtype. When repeating the experiments in this work, no relation between *AtERF#111* and ABA-signalling was detected. Furthermore, the *AtERF#111* transcript itself was not induced upon exogenous ABA treatment or drought stress, but was strongly responsive to mechanical stress. Overexpression of *AtERF#111* led to an altered root and shoot development. The effect of *ERF#111*-OE on global gene expression was investigated by microarray analysis. The expression data of the *ERF#111*-OE plants showed a significant overlap of genes induced by *ERF#111*-OE and the stress responses to wounding, hypoxia and submergence. Direct target genes of *AtERF#111* were identified, which also showed a link to the wounding response. The mutant *erf#111-2* displayed no differential gene expression after wounding in comparison to the wildtype. However, it is possible that other members of the GXERFs can compensate for the loss of *AtERF#111*.

AtLBD41 belongs to the subclass II of the plant specific LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) DOMAIN (LBD) transcription factor family and is closely related to *AtLBD40* and *AtLBD42*. As a member of the 49 core hypoxia-responsive genes, *AtLBD41* is strongly induced upon low-oxygen conditions in all cell

types of *A. thaliana*. Since AtLBD41 contains a C-terminal *ERF-associated amphiphilic repression* (EAR)-domain and has been shown to interact with co-repressors, it is predicted to act as a repressing transcription factor. In order to characterize AtLBD41, the EAR-domain was replaced by the viral transactivation domain VP16, thereby turning the repressor of gene expression in a potential activator. AtLBD41 and AtLBD41ΔEAR:VP16 were overexpressed in Arabidopsis protoplasts and the effect on the transcriptome was analyzed by microarray analysis. A set of potential target genes of AtLBD41 was identified, whose function in relation to hypoxia is mainly unknown. However, it was evident that these genes were repressed by hypoxia and induced upon subsequent reoxygenation. Since this expression pattern is *vice versa* regarding the expression of *AtLBD41*, it strengthens the hypothesis of AtLBD41 being a transcriptional repressor during hypoxia.

AtLBD41 is likely to act redundantly with AtLBD40 and AtLBD42. The mutant *lbd41* showed no modified hypoxia response regarding the putative target genes. Furthermore, expression of *AtLBD40* displayed a stronger induction in *lbd41* upon hypoxia in comparison to the wildtype. The effectors AtLBD40ΔEAR:VP16, AtLBD41ΔEAR:VP16 and AtLBD42ΔEAR:VP16 were all able to activate the promoters of the putative target genes in protoplast transactivation assays. Orthologous target genes of AtLBD41 were identified in rice, which could be regulated by LBD effectors of *A. thaliana*, thereby implying interspecific conservation of the LBD41 function. By using CRISPR/Cas9, the triple mutant *lbd40/lbd41/lbd42* was generated and seedlings displayed a significant decrease in survival rate after hypoxia in comparison to the wildtype. Finally, it was shown that AtLBD41 gets SUMOylated.

Zusammenfassung

Wie alle aerobe Organismen sind auch Pflanzen auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff angewiesen, um mittels oxidativer Phosphorylierung Energie zu generieren. Überflutung ist eine häufige Ursache von Sauerstoffmangel, da Sauerstoff in Wasser im Vergleich zur Luft eine sehr niedrige Diffusionsgeschwindigkeit aufweist. Um hypoxischen Bedingungen entgegenzuwirken, indem sowohl metabolische als auch morphologische Adaptationen induziert werden, ist eine effiziente sowie transiente Re-Programmierung der Genexpression für die Pflanze essentiell. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die beiden Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* *AtERF#111/ABSCISIC ACID REPRESSOR 1 (ABR1)* und *LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 41 (AtLBD41)* vor allem in Bezug auf Sauerstoffmangel zu charakterisieren.

AtERF#111/ABR1 gehört zu der Gruppe X der ERF/AP2 Familie (GXERFs) und wird Spross-spezifisch durch Überflutung und Hypoxie induziert. Ein Funktionsverlust von *AtERF#111* in *erf#111-2* Mutanten sowie eine stabile Überexpression (OE) in *ERF#111*-OE Linien hatten keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Pflanzen nach Überflutung. Da der N-Terminus von *AtERF#111* mit den Aminosäuren Methionin und Cystein initiiert, wurde das Protein als mögliches Substrat des *Arg/N-degron pathways* untersucht. Bei der Analyse der Proteinstabilität von (MA)*AtERF#111*, bei welchem der hoch konservierte N-terminale Cystein-Rest durch Alanin ersetzt wurde, konnten keine Unterschiede zur nativen Version MC(*AtERF#111*) festgestellt werden. Folglich wird *AtERF#111* unabhängig von seinem N-Terminus und damit nicht durch den *Arg/N-degron pathway* abgebaut. Eine Inhibierung des Proteasoms resultierte in einer deutlichen Akkumulation von *AtERF#111*. Demnach wird *AtERF#111* dennoch durch das Ubiquitin/Proteasom System degradiert.

AtERF#111 wurde zuvor als ein Repressor der Abscisinsäure (ABA)-Antwort beschrieben, wobei *erf#111* Mutanten eine hypersensitive ABA-Antwort im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Bei den in der Arbeit dargestellten Wiederholungen der Experimente konnte kein Zusammenhang zwischen *AtERF#111* und der ABA-Signalgebung aufgezeigt werden. Zudem wurde festgestellt, dass das Transkript von *AtERF#111* nicht durch exogen zugeführtes ABA oder Trockenstress, sondern sehr stark durch mechanischen Stress induziert wird. Eine Überexpression von *AtERF#111* führte in Pflanzen zu einer veränderten Wurzel- und Sprossentwicklung. Mittels Mikroarrayanalyse wurde ein Expressionsprofil von zwei *ERF#111*-OE Linien erstellt, wobei eine signifikant große Anzahl der durch *ERF#111*-OE induzierten Gene auch durch die Stressantworten auf Verwundung, Hypoxie oder Überflutung induziert wurden. Es wurden direkte Zielgene von *AtERF#111* identifiziert, welche ebenfalls eine Verbindung zur Verwundungsantwort belegten. Die Mutante *erf#111-2* zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Expression der Zielgene nach Verwundung auf. Es ist jedoch denkbar, dass weitere Mitglieder der GXERFs einen Funktionsverlust von *AtERF#111* kompensieren könnten.

AtLBD41 zählt zu der Klasse II der pflanzenspezifischen LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) DOMAIN (LBD) Familie von Transkriptionsfaktoren und ist sehr nah mit *AtLBD40* und *AtLBD42* verwandt. Als eines von 49 *core* Hypoxie-responsiven Genen wird *AtLBD41* bei Sauerstoffmangel in allen Zelltypen von *A. thaliana* sehr stark induziert. Da *AtLBD41* eine C-terminale *ERF-associated amphiphilic repression* (EAR)-Domäne aufweist und eine Interaktion mit Co-Repressoren gezeigt wurde, besteht die Annahme, dass *AtLBD41* als Repressor der Transkription fungiert. Zur Charakterisierung des Transkriptionsfaktors wurde die EAR-Domäne durch die virale Transaktivierungsdomäne VP16 ersetzt, um den Repressor der Genexpression in einen möglichen Aktivator umzufunktionieren. Anschließend wurde der Effekt einer Überexpression von *AtLBD41* und *AtLBD41ΔEAR:VP16* in Protoplasten mittels Mikroarray auf das Transkriptom analysiert. Dabei wurde eine Gruppe möglicher Zielgene von *AtLBD41* identifiziert, deren Funktion in Bezug auf Hypoxie noch weitestgehend unbekannt ist. Klar ist hingegen, dass diese bei Hypoxie reprimiert und bei Wiederbelüftung induziert werden. Da sich das Expressionsmuster der Zielgene *vice versa* zur Expression von *AtLBD41* verhält, stützt das die These der Funktion von *AtLBD41* als transkriptionellen Repressor bei Sauerstoffmangel.

AtLBD41 agiert wahrscheinlich redundant mit *AtLBD40* und *AtLBD42*. Ein Funktionsverlust von *AtLBD41* führte zu keiner modifizierten Expression der Zielgene bei Hypoxie. Darüber hinaus wurde die Expression von *AtLBD40* in der Mutante *lbd41* im Vergleich zum Wildtyp bei Hypoxie verstärkt induziert. Die Effektoren *AtLBD40ΔEAR:VP16*, *AtLBD41ΔEAR:VP16* und *AtLBD42ΔEAR:VP16* waren alle in der Lage, die Promotoren der Zielgene im Rahmen von Transaktivierungsassays in Protoplasten zu aktivieren. Es konnten orthologe Zielgene von *AtLBD41* in Reis identifiziert werden, die ebenfalls durch die Effektoren aus *A. thaliana* reguliert werden konnten und damit eine hohe interspezifische Konservierung der Funktion von LBD41 vermuten lassen. Mittels CRISPR/Cas9 wurde die Dreifachmutante *lbd40/lbd41/lbd42* generiert, für welche im Keimlingsstadium eine signifikant schlechtere Überlebensrate bei Hypoxie im Vergleich zum Wildtyp demonstriert wurde. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass *AtLBD41* posttranslational durch SUMOylierung modifiziert wird.

1 Einleitung

1.1 Pflanzen benötigen Sauerstoff zum Überleben

Sauerstoff macht 21 Volumenprozent der modernen Atmosphäre aus. Dies war jedoch nicht immer so – vor mehr als 2,3 Milliarden Jahren entstanden die ersten Cyanobakterien, welche in der Lage waren, Sauerstoff durch Photosynthese zu produzieren, und den Weg zu aeroben Lebensformen geebnet haben, wie wir sie heute kennen (Bendall et al., 2008; Lyons et al., 2014).

So sind auch Pflanzen als aerobe Organismen auf die Verfügbarkeit von Sauerstoff angewiesen. Sauerstoff dient als Substrat in vielen Reaktionen des pflanzlichen Metabolismus, wie zum Beispiel der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder der Synthese der Phytohormone Ethylen, Abscisinsäure (ABA) oder Gibberellinsäure (GA) (van Dongen & Licausi, 2015). Tatsächlich ist Sauerstoff mit mehr als 350 sauerstoffabhängigen Reaktionen eines der meist verwendeten Moleküle in eukaryotischen Organismen (Raymond & Segrè, 2006; Schmidt et al., 2018). Als terminaler Elektronenakzeptor in der oxidativen Phosphorylierung ist Sauerstoff essentiell, um die Generierung des universellen Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) sicherzustellen. Pflanzen besitzen anders als Tiere kein effizientes Transportsystem für Sauerstoff, sodass dessen Verteilung lediglich durch Diffusion erfolgt (van Dongen et al., 2009). Die Versorgung mit Sauerstoff ist daher von der Länge des Transportwegs, der Durchlässigkeit des Gewebes und der Respirationsrate der Zellen abhängig. Nicht selten fallen daher die zellulären Sauerstoffkonzentrationen in Meristemen, Samen, aber auch in Wurzeln im Vergleich zu photosynthetisch aktiven Blättern rapide ab, obwohl außerhalb ein hoher Sauerstoffpartialdruck vorherrscht (Colmer, 2003; Greve et al., 2003; van Dongen & Licausi, 2015). Sauerstoffmangel wird dabei als Hypoxie bezeichnet, während man beim vollständigen Fehlen von Sauerstoff von Anoxie spricht (Sasidharan et al., 2017). Die Bereiche geringer Sauerstoffkonzentration innerhalb der Pflanze können sich merklich ausdehnen, sobald die Verfügbarkeit aus dem externen Milieu limitiert ist. Vor allem Überflutungsereignisse führen zu einem stark eingeschränkten Gasaustausch zwischen der Pflanze und ihrer Umwelt, da die Diffusionsgeschwindigkeit von Gasen im Wasser um den Faktor 10^4 im Vergleich zur Luft abnimmt (Armstrong, 1980; Jackson, 1985). Das gasförmige Phytohormon Ethylen akkumuliert, während ein Defizit an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sowohl Respiration als auch Photosynthese inhibiert und zu einer Energiekrise führt (Sasidharan et al., 2017). Ob dennoch ein gewisser Grad der Unterwasserphotosynthese möglich ist, hängt von der Lichtdurchlässigkeit und daher von der Tiefe sowie Trübheit des Flutwassers ab (Lee et al., 2011; Vashist et al., 2011; van Veen et al., 2013). Überflutete Wurzeln leiden sehr schnell unter hypoxischen Bedingungen: Für *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) wurde gezeigt, dass die Wurzeln schon unter normaler Bewässerung meist hypoxisch sind, jedoch bei Überflutung innerhalb von 15 min anoxisch

werden, da der restlich vorhandene Sauerstoff schnell durch aerobe Mikroorganismen verbraucht wird (Vashisht et al., 2011). Darüber hinaus weisen wassergesättigte Böden ein niedriges Redox-Potential auf, sodass Schwermetalle wie Eisen oder Mangan löslich werden und von der Pflanze vermehrt aufgenommen werden können (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). Anaerobe Bakterien bilden zudem toxische Stoffwechselprodukte wie Acetaldehyd und Methan (Drew & Lynch, 1980; Blom & Voeselek, 1996).

Insgesamt muss Überflutung also als sequentieller Stress mit vielen verschiedenen Komponenten betrachtet werden, denn auch der Rückgang der Flut kann eine große Herausforderung für die Pflanze darstellen: Die plötzlich hohe Verfügbarkeit von Sauerstoff führt zu oxidativen Schäden durch die gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Tamang & Fukao, 2015; Yeung et al., 2019). Ebenso kann die erneut hohe Lichtintensität photooxidative Schäden an den Reaktionszentren des Photosystems II hervorrufen und zur Photoinhibierung führen (Ruban, 2015). Aber auch Nährstoffmangel, höheres Risiko der Pathogeninfektion, geringere Resistenz gegen Herbivore sowie Trockenstress aufgrund einer Beschädigung des Wurzelsystems sind Stressfaktoren, welchen die Pflanze während und auch nach Überflutung ausgesetzt ist (Tamang & Fukao, 2015).

Aufgrund des Klimawandels sieht sich die Landwirtschaft auf der ganzen Welt mit extremen Wetterbedingungen konfrontiert – vor allem abwechselnde Perioden von Dürre oder Überschwemmung stellen neben wirtschaftlichen, materiellen und sozialen Herausforderungen eine extreme Bedrohung für die Nahrungssicherung dar (Fukao et al., 2019). Zwischen 2006 und 2016 waren Überflutungen die Ursache für fast zwei Drittel der Ernteausfälle weltweit, angeführt von den desaströsen Schäden extremer Monsunregen in Pakistan 2010 in Höhe von 4,5 Milliarden US-Dollar (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017). Mehrere aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Frequenz von schweren bis extremen hydrologischen Ereignissen, wie starken Regenfällen oder Überflutungen, in den letzten Jahrzehnten merklich zugenommen hat und bis zum Ende des Jahrhunderts eine weitere Steigerung von Überschwemmungen in den meisten Teilen der Erde prognostiziert wird (Hirabayashi et al., 2008; Hirabayashi et al., 2013; Alfieri et al., 2017). Demnach ist es von großem Interesse, die Mechanismen der Pflanze, die zur Überflutungstoleranz beitragen, zu entschlüsseln und zu verstehen, um Strategien zur Verbesserung der Toleranz von Nutzpflanzen zu entwickeln.

1.2 Anpassungsstrategien von Pflanzen bei Überflutung und Sauerstoffmangel

Verschiedenste Pflanzenarten weisen eine extreme Diversität bezüglich ihrer Überflutungstoleranz auf. Während viele Nutzpflanzen wie Mais, Weizen und Kartoffel sehr empfindlich gegenüber Überflutungsstress sind, können Arten aus Feuchtgebieten, zum Beispiel Reis oder auch der Sumpfpfänger

Rumex palustris, wochenlang im Wasser stehen und Wasserpflanzen sogar dauerhaft überflutet leben (Fukao & Bailey-Serres, 2004; Bailey-Serres & Voeselek, 2008; Bailey-Serres & Colmer, 2014).

Pflanzen haben daher unterschiedliche Strategien entwickelt, um sowohl ihre Morphologie als auch ihren Metabolismus bei Überflutung anzupassen, welche im Wesentlichen in zwei Hauptformen unterteilt werden können: Aufrechterhaltung des Gasaustauschs innerhalb des Pflanzengewebes durch morphologische Anpassungen (1) und Adaptationen des Stoffwechsels an eine geringe Sauerstoffverfügbarkeit (2). Die Dynamiken der Gase Ethylen und/oder Sauerstoff sind dabei die wichtigsten Regulatoren dieser Antworten (Voeselek & Sasidharan, 2013).

1.2.1 Morphologische Anpassungen

Das gasförmige Phytohormon Ethylen wird in allen Zellen höherer Pflanzen produziert (Abeles et al., 1992) und es wurde gezeigt, dass dessen passive Akkumulation bei Überflutung eine Reihe morphologischer Adaptationen in vielen verschiedenen Pflanzenarten induziert (Voeselek & Sasidharan, 2013; Voeselek & Bailey-Serres, 2015). Im Gegensatz zu Sauerstoff und CO₂ hängt die Konzentration von Ethylen nicht von der Lichtverfügbarkeit ab, was eine Anreicherung zu einem sehr frühen und verlässlichen Signal für Überflutung macht, noch bevor hypoxische Bedingungen vorherrschen (Voeselek & Sasidharan, 2013).

Morphologische Anpassungen bei Überflutung dienen in erster Linie dazu, eine Versorgung der unter Wasser liegenden Pflanzenorgane mit Sauerstoff aufrechtzuerhalten (Voeselek & Sasidharan, 2013; Yamauchi et al., 2018). Einige Pflanzen sind in der Lage, zu diesem Zweck sogenannte Aerenchyme auszubilden – ein Pflanzengewebe, das mittels luftgefüllter Hohlräume einen Gasaustausch überfluteter Pflanzenorgane bis hin zur Wurzelspitze ermöglicht. Solch große Interzellularräume entstehen in Wurzelrinde, Sprossachse oder Blatt entweder durch Ausdehnung von Zellen (schizogene Interzellularen) oder durch deren Auflösung (lysigene Interzellularen), was neben einem verbesserten Gasaustausch zudem die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen reduziert (Justin & Armstrong, 1987; Drew et al., 2000). Während Aerenchyme bei überflutungstoleranten Pflanzen wie Reis oder *Rumex palustris* konstitutiv gebildet werden, werden diese bei Mais, Weizen oder Gerste erst durch Überflutung induziert (Colmer, 2003; Colmer & Voeselek, 2009; Yamauchi et al., 2018).

Um ein Herausdiffundieren des Sauerstoffs aus der Wurzel in den Boden zu verhindern, können zum Beispiel die Wurzeln von Reis oder *Zea mays* eine gasundurchlässige Barriere ausbilden (Armstrong, 1980; Colmer, 2003; Abiko et al., 2012). Diese entsteht in der äußersten Zellschicht der Wurzel womöglich durch Akkumulation von Suberin (Watanabe et al., 2013; Shiono et al., 2014).

Auch die Ausbildung eines Gasfilms auf der sehr hydrophoben Blattoberfläche kann den Gasaustausch der Pflanze bei Überflutung verbessern (Pedersen et al., 2009). Die Expression des Wachs-Synthese-

Gens *Leaf Gas Film 1 (LGF1)* trägt in Reis maßgeblich dazu bei, dass auf den Blättern der Reispflanzen ein Gasfilm ausgebildet wird und so die Unterwasser-Photosyntheserate gesteigert wird, was sich positiv auf die Überlebensrate bei Überflutung auswirkt (Kurokawa et al., 2018).

Einige Pflanzen sind in der Lage, durch hyponastisches Wachstum ihre Blätter bei Überflutung nach oben zu bewegen, um die Wasseroberfläche zu erreichen und einen Gasaustausch zu ermöglichen. Dieser Vorgang wird ebenfalls durch Ethylen induziert und wurde in Sumpfpflanzen wie *Rumex palustris* (Cox et al., 2003), aber auch in Pflanzen, die nicht aus Feuchtgebieten stammen, wie *A. thaliana* (Lee et al., 2011) beobachtet.

Zudem kann die interne Versorgung mit Sauerstoff durch die Ausbildung von Adventivwurzeln verbessert werden, die zudem meist eine deutlich höhere Porosität als das primäre Wurzelsystem aufweisen (Visser et al., 1996; Voeselek & Sasidharan, 2013). Andere Pflanzen können wiederum ein rapides Längenwachstum einleiten, um einen Teil ihrer Organe über der Wasseroberfläche zu halten. So elongiert zum Beispiel *Rumex palustris* seine Petiolen (van Veen et al., 2013), während der Spross von Tiefwasserreis bei Überflutung sogar bis zu 25 cm pro Tag wachsen und eine Höhe von sieben Metern erreichen kann (Kende et al., 1998; Vriezen et al., 2003).

Diese sogenannte *Escape*-Strategie zur Vermeidung von Sauerstoffmangel ist energetisch sehr teuer und nur erfolgreich, falls die Energiereserven ausreichen, um einen Kontakt mit der Wasseroberfläche herzustellen. Daher unterdrückt zum Beispiel Flachlandreis bei Überflutung Metabolismus und Wachstum und nutzt die restlichen Energiereserven zum Durchhalten der Überflutungsperiode im Rahmen der *Quiescence*-Strategie (s. Abschnitt 1.4) (Bailey-Serres et al., 2012).

1.2.2 Metabolische Anpassungen

Natürlich ist es nicht immer möglich, durch oben genannte morphologische Anpassungen einen Sauerstoffmangel zu vermeiden. Die Verfügbarkeit von Sauerstoff ermöglicht einen kontinuierlichen Fluss des aus der Glykolyse entstandenen Pyruvats in den Trikarbonsäurezyklus und den konstanten Transfer von Elektronen in den Intermembranraum der Mitochondrien, wo sie an die Matrix mittels F_1F_0 -ATP-Synthase zurückgegeben werden. Fällt die Sauerstoffkonzentration unter die Affinität der terminalen Cytochrom-c-Oxidase, so fällt das zelluläre ATP:ADP Verhältnis rapide ab, da die Bildung von ATP mittels oxidativer Phosphorylierung inhibiert wird (Bailey-Serres & Voeselek, 2008; Millar et al., 2011).

Energie in Form von ATP kann nun nur noch im Rahmen der Glykolyse weiter produziert werden, welche bei Sauerstoffmangel daher stark induziert wird – ein Phänomen, das unter dem Begriff Pasteur-Effekt bekannt ist (Summers et al., 2000). Die Ausbeute der Glykolyse liegt jedoch mit ca. zwei bis drei Molekülen ATP per Glukosemolekül deutlich unter den mehr als 30 Molekülen ATP, welche durch den oxidativen Metabolismus der Glukose unter aeroben Bedingungen generiert werden könnten (Drew,

1997; Magneschi & Perata, 2009). Da bei der Glykolyse NAD^+ verbraucht wird und sich die reduzierte Form NADH anreichert, muss eine Oxidierung von NADH gewährleistet werden. Dies geschieht im Rahmen der Fermentation mit Pyruvat als Substrat, wobei durch Alkohol- und Milchsäuregärung hauptsächlich Ethanol und Laktat entstehen. Das Enzym Laktatdehydrogenase katalysiert dabei die Bildung von Laktat aus Pyruvat, während bei der Alkoholgärung zunächst aus Pyruvat mittels Pyruvatdecarboxylase Acetaldehyd entsteht, gefolgt von einer Reduktion zu Ethanol mittels Alkoholdehydrogenase (Perata & Alpi, 1993; Geigenberger, 2003). Es wird angenommen, dass der cytosolische pH-Wert darüber entscheidet, welche Form der Gärung vorherrscht – ein saures Milieu inhibiert die Aktivität der Laktatdehydrogenase, wohingegen das pH-Optimum der Pyruvatdecarboxylase im sauren Bereich liegt (Davies et al., 1974; Davies, 1980). So wurde für Reispflanzen gezeigt, dass bei Anoxie fast 92 % des Pyruvats in Ethanol und nur 1 % in Laktat umgewandelt wird (Kato-Noguchi, 2006). Pyruvat kann zudem über andere Stoffwechselwege zu den Endprodukte γ -Aminobuttersäure (GABA) und Succinat metabolisiert werden. Zudem können aus Pyruvat und Glutamat mittels Alanin-Aminotransferase die Produkte Alanin und 2-Oxoglutarat entstehen (Bailey-Serres et al., 2012). 2-Oxoglutarat kann wiederum im Rahmen des modifizierten Trikarbonsäurezyklus weiter zu Succinat umgesetzt werden, wodurch zusätzliches ATP generiert wird (Rocha et al., 2010; Sweetlove et al., 2010).

Darüber hinaus werden bei hypoxischen Bedingungen energieverbrauchende, nicht essentielle Vorgänge, wie z.B. die Synthese von Stärke, Proteinen und Lipiden sehr schnell heruntergefahren (Geigenberger, 2003; Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass bei Hypoxie weniger als die Hälfte der mRNAs aktiv translatiert wird, was pro Aminosäure 4 Moleküle ATP einspart (Branco-Price et al., 2008). Dass Hypoxie-responsive Gene dennoch translatiert werden, könnte so zu erklären sein, dass deren Sequenzen relativ frei von Nukleosomen sind und mit epigenetischen Markern assoziiert sind, die eine aktive Transkription fördern (Branco-Price et al., 2005; Sorenson & Bailey-Serres, 2014; Lee & Bailey-Serres, 2019). Die selektive Translation könnte zudem calciumabhängig reguliert werden, wobei CALMODULIN38 (CLM38) als potentieller Calciumsensor bei Hypoxiestress in Arabidopsis identifiziert wurde (Lokdarshi et al., 2016).

Zudem werden bei Sauerstoffmangel Enzyme induziert, welche Pyrophosphat als alternative Energiequelle an Stelle von ATP nutzen können (Geigenberger, 2003; Greenway & Gibbs, 2003; Mustroph et al., 2005; Huang et al., 2008) sowie Saccharose-Synthasen, die für einen energieeffizienten Abbau von Saccharose sorgen (Guglielminetti et al., 1995; Santaniello et al., 2014).

1.3 Der *Arg/N-degron pathway* als Sauerstoffsensor in Pflanzen

Wie können Organismen einen Sauerstoffmangel wahrnehmen und darauf reagieren? Sowohl in Tieren (Kaelin & Ratcliffe, 2008; Ratcliffe, 2013) als auch Pflanzen (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011) wurden Schlüsselregulatoren der Hypoxieantwort identifiziert. Interessanterweise beruhen beide Mechanismen auf der sauerstoffabhängigen Regulation der Stabilität von Hauptregulatoren anaerober Genexpression und weisen eine hohe funktionelle Ähnlichkeit auf (Gibbs & Holdsworth, 2020).

In Tieren wird der heterodimere Regulator *Hypoxia-inducible Factor* (HIF) konstitutiv exprimiert und an konservierten Prolinresten von HIF α (Ivan et al., 2001) durch Prolylhydroxylasen sauerstoffabhängig hydroxyliert (Bruick & McKnight, 2001; Epstein et al., 2001). Durch diese Modifikation wird HIF α für einen Ubiquitin-abhängigen Abbau durch das 26S-Proteasom markiert (Maxwell et al., 1999). Aufgrund einer geringen Aktivität der Prolylhydroxylasen in Abwesenheit von Sauerstoff akkumuliert HIF α bei Hypoxie, kann mit seiner β -Untereinheit Heterodimere im Nukleus bilden und so die Expression verschiedener Zielgene induzieren (Depping et al., 2008). Letztere wurden direkt mit der Entwicklung von Blutgefäßen assoziiert (Kwon et al., 2002).

In Arabidopsis wird die Sauerstoffwahrnehmung durch eine homöostatische Regulation der Stabilität einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren (TFs), der Gruppe VII der *Ethylene Response Factors* (GVIIEFs), durch den sogenannten *Arg/N-degron pathway* in Abhängigkeit von Sauerstoff und Stickstoffmonoxid (NO) ermöglicht (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011; Gibbs et al., 2014; Dissmeyer, 2019). Wie der Name *N-degron pathway* impliziert, bestimmt die Identität des Amino (N)-Terminus die Halbwertszeit eines Proteins *in vivo*, wobei das N-terminale Abbausignal als N-Degron bezeichnet wird (Varshavsky, 2011). In Eukaryoten ist der *N-degron pathway* Teil des Ubiquitin (Ub)-Proteasom Systems und markiert durch die Konjugation von Ub an Proteine durch E3 Ub-Ligasen diese für den Abbau durch das 26S-Proteasom. Während in Tieren verschiedene Zweige, nämlich der *Ac/N-degron pathway* (Acetylierung), der *Arg/N-degron pathway* (Arginylierung) und der *Pro/N-degron pathway* (initiiert durch N-terminales Prolin) identifiziert wurden, wurde der *Arg/N-degron pathway* in Pflanzen bisher am meisten untersucht (Gibbs et al., 2014; Dissmeyer, 2019; Varshavsky, 2019). In Arabidopsis existieren mindestens zwei E3 Ubiquitin-Ligasen mit unterschiedlicher Substratspezifität, PROTEOLYSIS (PRT)1 und PRT6. Während PRT1 hydrophobe primär-destabilisierende Reste (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Leucin, Isoleucin) erkennt, markiert PRT6 Proteine mit basischen N-terminalen Resten (Arginin, Lysin, Histidin) für den Abbau durch das Proteasom (Varshavsky, 1996).

Die GVIIEFs zählen in Arabidopsis fünf Mitglieder: *RELATED TO APETALA 2.2* (*AtRAP2.2*), *AtRAP2.3*, *AtRAP2.12*, *HYPOXIA RESPONSIVE ERF1* (*AtHRE1*) und *AtHRE2*. Während *AtHRE1* und *AtHRE2* erst durch Hypoxie induziert werden, werden *AtRAP2.2*, *AtRAP2.3* und *AtRAP2.12* konstitutiv exprimiert

(Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011). Sie besitzen am N-Terminus ein konserviertes MCGGAI(I/L) Motiv, dessen initiierendes Methionin (Met1) konstitutiv durch METHIONIN AMINOPEPTIDASEN (AtMAP1/2) entfernt wird, und somit das Cystein (Cys2) N-terminal exponiert wird. Man spricht von primär-, sekundär- oder tertiär destabilisierenden Resten des N-Degrans, je nachdem, welche Anzahl an enzymatischen Modifikationsschritten zum Abbau des Proteins erforderlich sind. Der tertiär destabilisierende Rest Cys2 wird zunächst entweder enzymatisch in Abhängigkeit von Sauerstoff durch PLANT CYSTEIN OXIDASEN (AtPCO1/2) (Weits et al., 2014; White et al., 2017; White et al., 2018) oder nicht enzymatisch durch NO (Gibbs et al., 2014) zu dem sekundär destabilisierenden Rest ^oCys2 oxidiert. Anschließend fügen ARGININ-tRNA PROTEINTRANSFERASEN (AtATE1/2) den primär destabilisierenden Rest Arginin an (White et al., 2017), wodurch das Protein durch AtPRT6 erkannt und damit für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert wird (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011).

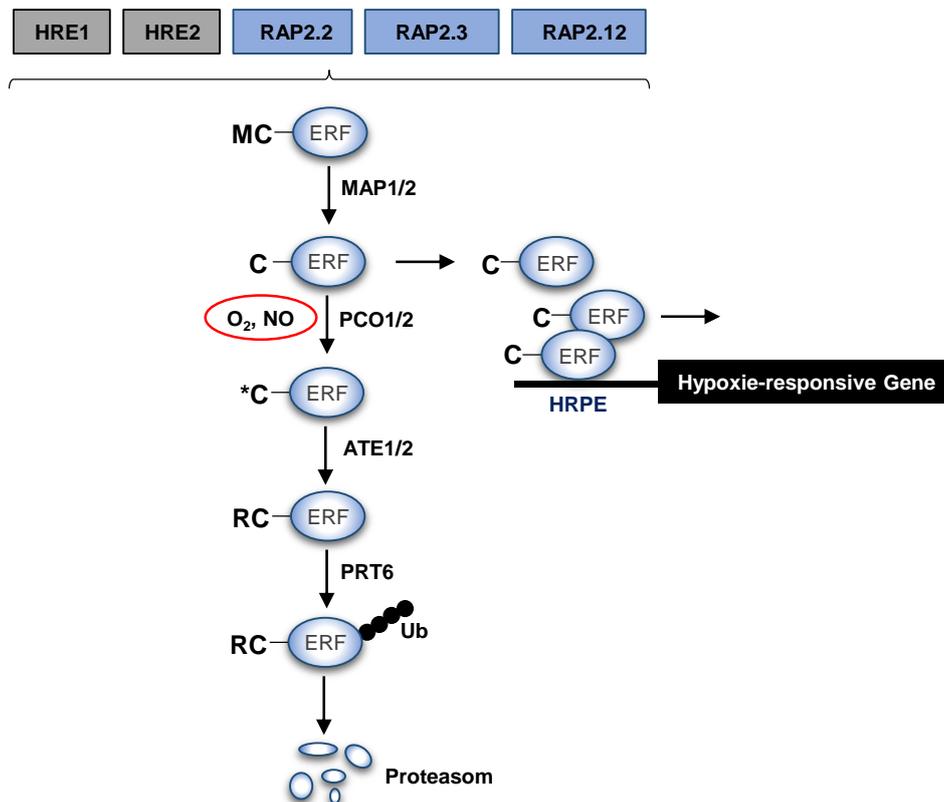


Abb. 1 | Der Arg/N-degron pathway vermittelt die Sauerstoffwahrnehmung in Pflanzen.

Unter normoxischen Bedingungen werden die GVIIERFs AtHRE1, AtHRE2, AtRAP2.2, AtRAP2.3 und AtRAP2.12 destabilisiert. Zunächst schneiden METHIONIN AMINOPEPTIDASEN (AtMAP1/2) konstitutiv das N-terminale Methionin ab, und das freigelegte Cystein kann O₂/NO abhängig durch die PLANT CYSTEIN OXIDASEN (AtPCO1/2) oxidiert werden (*C). ARGININ-tRNA PROTEINTRANSFERASEN (AtATE1/2) fügen einen Argininrest an das oxidierte Cystein (RC). Die Proteinligase PROTEOLYSIS 6 (PRT6) polyubiquitiniert (Ub) das Protein und leitet den Abbau durch das 26S Proteasom ein. Durch das Fehlen von O₂ und/oder NO werden die GVIIERFs stabilisiert, können an das Hypoxie-responsive Promotorelement (HRPE) binden (nachgewiesen für AtRAP2.2, AtRAP2.3 und AtRAP2.12) und die Transkription Hypoxie-responsiver Gene induzieren.

Hypoxische Bedingungen oder ein Fehlen von NO sind für die Stabilisierung der GVIERFs ausreichend, welche dann die Transkription von Hypoxie-responsiven Genen (HRGs) induzieren, indem sie an das 12 bp lange Hypoxie-responsive Promotorelement (HRPE) ihrer Zielgene binden (Bui et al., 2015; Gasch et al., 2016). Interessanterweise wurde erst kürzlich gezeigt, dass auch Ethylen die Stabilität der GVIERFs erhöht und so die Pflanze auf hypoxische Bedingungen vorbereitet, indem der NO-Scavenger PHYTOGLOBIN1 durch Ethylen induziert wird (Hartman et al., 2019).

Für den Transkriptionsfaktor AtRAP2.12 wurde gezeigt, dass dieser durch eine Interaktion mit den ACYL-COA BINDING PROTEINS (AtACBP1/2) an die Plasmamembran assoziiert und so von einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* in Anwesenheit von Sauerstoff geschützt wird (Licausi et al., 2011). Ein Abfall der externen Sauerstoffverfügbarkeit unter 10 % ist ausreichend, um eine Relokalisierung von AtRAP2.12 in den Nukleus zu bewirken und die Expression von Zielgenen zu regulieren (Kosmacz et al., 2015).

1.4 GVIERFs in Reis als Regulatoren der *Quiescence*- und *Escape*-Strategie

Reis ist als semiaquatische Pflanze auf eine hohe Wasserverfügbarkeit angewiesen. Dennoch sterben die meisten Reiskultivare innerhalb einer Woche vollständiger Überflutung, was eine große Bedrohung für die Reisproduktion in Ost- und Südostasien darstellt (Xu et al., 2006; Bailey-Serres et al., 2010). Mit Hilfe der entgegengesetzten Wachstumsstrategien *Quiescence* und *Escape* sind jedoch einige wenige Kultivare tolerant gegenüber Überflutung. Es konnte gezeigt werden, dass die *Escape*-Strategie in Tiefwasserreis durch die GVIERFs SNORKEL1 und 2 reguliert wird, indem diese eine Akkumulation von GA und damit eine Elongation der Internodien bewirken, um so dem Flutwasser zu entkommen (Hattori et al., 2009).

Der GVIERF SUBMERGENCE1-A1 (SUB1-A1) hingegen wurde in Reispflanzen der überflutungstoleranten Sorte FR13A aus Ostindien als Hauptregulator der *Quiescence*-Strategie identifiziert (Xu et al., 2006). SUB1A induziert die Gene *SLENDER RICE1* und *SLENDER RICE LIKE 1*, zwei negative Regulatoren der GA-Signalgebung (Fukao et al., 2006; Fukao & Bailey-Serres, 2008). In Folge dessen wird eine Elongation der Internodien unterdrückt und Energie eingespart. *SUB1-A1* wurde unter anderem in Swarna, der am häufigsten vorkommenden Reissorte in Indien, eingekreuzt. Swarna-*SUB1-A1* Reisfelder, welche für zehn Tage überflutet wurden, erzielten einen deutlich höheren Ertrag gegenüber der ursprünglichen Sorte und werden zunehmend in Indien und Bangladesch angebaut (Dar et al., 2013).

Obwohl *SUB1-A1* ebenfalls ein charakteristisches N-terminales Met-Cys Motiv besitzt, entgeht der Transkriptionsfaktor einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* (Gibbs et al., 2011). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das N-degron von *SUB1-A1* durch eine Interaktion mit dem Carboxy (C)-

Terminus maskiert wird und somit ein Abbau verhindert wird (Lin et al., 2019). Zudem wurden weitere GVIIFERF Gene in Reis identifiziert, *OsERF66* und *OsERF67*, welche durch *SUB1-A1* bei Überflutung induziert werden und im Gegensatz zu *SUB1-A1* selbst einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* unterliegen (Lin et al., 2019). Womöglich kann Reis durch diese Regulation Überflutung von anderen Stressantworten, die durch *SUB1-A1* reguliert werden, unterscheiden (Lin et al., 2019). Beide SNORKEL TFs besitzen ebenfalls ein Met-Cys Motiv, wurden aber noch nicht als Substrate des *N-degron pathways* untersucht.

1.5 Identifikation einer konservierten Hypoxieantwort

Eine genomweite Analyse zelltypspezifischer Transkription und Translation bei Hypoxie in *A. thaliana* führte zur Identifikation eines Sets von 49 sogenannten *core* HRGs, welche in allen untersuchten Zelltypen bei Sauerstoffmangel induziert wurden (Mustroph et al., 2009). Diese Antwort scheint interspezifisch konserviert, da viele der Gene auch in anderen Arten bei Sauerstoffmangel induziert werden (Mustroph et al., 2010). Reynoso et al. (2019) identifizierten 68 Genfamilien (*submergence-upregulated families*, SURFs), welche sowohl in Reis, *Medicago truncatula* und zwei Solanum Arten bei Sauerstoffmangel induziert werden, welche ebenfalls 17 der 49 *core* HRGs aus Arabidopsis beinhalten. 39 der 49 *core* HRGs sind aufgrund eines HRPE Motivs in ihren Promotorsequenzen putative direkte Zielgene der GVIIFERFs (Gasch et al., 2016). Die Funktion der Hälfte der Gene ist bisher noch unbekannt (Mustroph et al., 2009; Mustroph et al., 2010). Bekannte *core* HRGs codieren unter anderem für Enzyme, die an Fermentation und Metabolismus beteiligt sind, wie *ALCOHOL DEHYDROGENASE* (*AtADH1*), *ALANINE AMINOTRANSFERASE* (*AtALAAT1/2*) oder *PYRUVAT DECARBOXYLASE* (*AtPDC1/2*), aber auch für Enzyme zum Zuckerabbau, wie etwa *SUCROSE SYNTHASE 4* (*AtSUS4*) oder *PHOSPHOFRUCTOKINASE 6* (*AtPFK6*) (Mustroph et al., 2009).

Unter den *core* HRGs befinden sich mindestens drei Transkriptionsfaktoren (TFs), welchen als potentiellen Modulatoren der Hypoxieantwort besondere Bedeutung beigemessen werden muss: *AtHRE2*, *HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR1* (*AtHRA1*) und *LOB DOMAIN CONTAINING PROTEIN 41* (*AtLBD41*). Der GVIIFERF *AtHRE2* spielt wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle in der Aktivierung der *core* HRGs (Bui et al., 2015; Gasch et al., 2016), wurde aber wiederholt mit einer Anpassung der Wurzelarchitektur bei Sauerstoffmangel und Überflutung in Verbindung gebracht (Lee et al., 2015; Eysholdt-Derzsó & Sauter, 2017; Eysholdt-Derzsó & Sauter, 2019). Für *AtHRA1* wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor durch physische Interaktion die Aktivität von *AtRAP2.12* bei Hypoxie herabsenkt und somit die anaerobe Antwort inhibiert. Dieser Feedback-Mechanismus ermöglicht wahrscheinlich vor allem bei fluktuierenden Hypoxie-Bedingungen eine schnelle Anpassung der Sauerstoffmangelantwort (Giuntoli et al., 2014; Giuntoli et al., 2017). Die Funktion von *AtLBD41* ist hingegen noch völlig ungeklärt.

1.6 Der Transkriptionsfaktor AtLBD41

1.6.1 Die LBD-Genfamilie

AtLBD41 zählt zu der Klasse II der pflanzenspezifischen LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB) DOMAIN (LBD) Familie von Transkriptionsfaktoren, auch bekannt als ASSYMETRIC LEAVES2 (AS2) LIKE (ASL) Familie. Die Familie zählt in *A. thaliana* 42 Mitglieder und wurde anhand der Ähnlichkeit in Bezug auf die Aminosäuresequenz der N-terminalen LOB-Domäne in Klasse I (36 Mitglieder) und Klasse II (6 Mitglieder) unterteilt (Iwakawa et al., 2002) (Abb. 2).

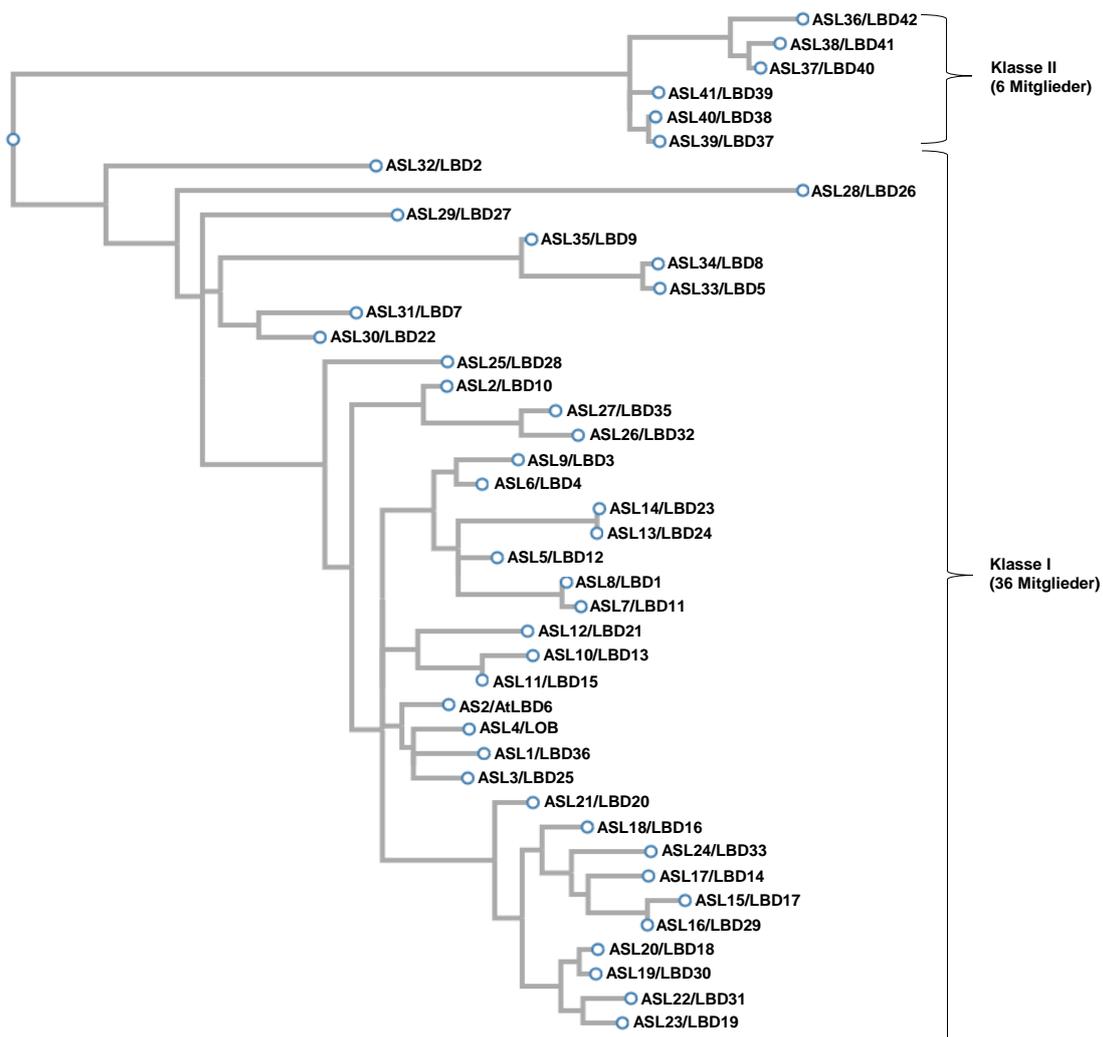


Abb. 2 | Phylogenetischer Stammbaum der 42 Mitglieder der LBD-Genfamilie aus *A. thaliana*.

Der Distanz-basierte Stammbaum wurde mittels der Funktion "build" von ETE3 v3.0.0b32 (Huerta-Cepas et al., 2016) generiert, zur Verfügung gestellt von GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools/ete/>). Dabei wurde die Software PhyML v20160115 (Guindon et al., 2010) und der BioNJ Algorithmus (Gascuel, 1997) verwendet. Als Grundlage diente ein multiples Alignment der Proteinsequenzen. Analog zu Iwakawa et al. (2002) wurden die Mitglieder den Klassen I und II zugeordnet.

Die LOB-Domäne besteht aus einem konservierten C-Block (CX₂CX₆CX₃C), welcher für die DNA-Bindung wichtig ist und einem zusätzlich Gly-Ala-Ser (GAS)-Block (Iwakawa et al., 2002; Shuai et al., 2002; Matsumura et al., 2009; Majer & Hochholdinger, 2011). Ausschließlich die Mitglieder der Klasse I LBDs besitzen innerhalb der LOB-Domäne ein Leucin-Zipper ähnliches *coiled-coil* Motiv (LX₆LX₃LX₆L), welches wahrscheinlich für Protein-Protein Interaktionen und Dimerisierung relevant ist (Shuai et al., 2002; Pandey & Kim, 2017). In Reis wurden 35 LBD Homologe identifiziert und in Mais und Pappel besteht die LBD-Genfamilie aus 34 und 57 Mitgliedern (Yang et al., 2006; Zhu et al., 2007; Schnable et al., 2009; Majer & Hochholdinger, 2011).

Das ursprünglich in Arabidopsis entdeckte Gen *AtLOB* wird wie viele weitere Vertreter der Klasse I LBDs an der Basis der adaxialen Seite von lateralen Organen exprimiert, wodurch diese unter anderem eine kritische Rolle in der frühen Blattentwicklung einnehmen (Shuai et al., 2002; Wang et al., 2013). *AtLBD6* zum Beispiel reguliert die Ausbildung der adaxialen/abaxialen Blattpolarität, indem es einen negativen Effekt auf die Expression von KNOX Transkriptionsfaktoren ausübt (Iwakawa et al., 2007). Die Mitglieder der LBD-Genfamilie besitzen jedoch sehr unterschiedliche Expressionsmuster und eine hohe funktionelle Diversität. Sie sind unter anderem an Prozessen wie Pollenentwicklung (*AtLBD10*, *AtLBD27*), Photomorphogenese (*AtLBD25*) oder Pathogenantwort (*AtLBD20*, *AtLBD16*) beteiligt (Majer & Hochholdinger, 2011; Xu et al., 2016).

Die Vertreter der Klasse II LBDs umfassen *AtLBD37* bis *AtLBD42*. *AtLBD37* und die nah verwandten Gene *AtLBD38* und *AtLBD39* agieren wahrscheinlich redundant und werden durch Stickstoff und Nitrat induziert (Rubin et al., 2009; Albinsky et al., 2010). In Reaktion auf exogene Stickstoffverfügbarkeit inhibieren sie die Gene *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT (AtPAP)1* und *2* und regulieren somit die Anthocyanbiosynthese negativ (Rubin et al., 2009).

1.6.2 *AtLBD41* bei Sauerstoffmangel

AtLBD41 ist Teil der 49 *core* HRGs (Mustroph et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass dessen Transkript sehr stark durch Hypoxie und Überflutung akkumuliert, jedoch bei Wiederbelüftung schnell auf ein basales Expressionsniveau zurückfällt (Hsu et al., 2013; Tsai et al., 2014). Orthologe Gene des TFs werden in allen bislang untersuchten Arten ebenfalls durch Hypoxie induziert, darunter neben weiteren Brassicaceae (Gasch et al., 2016) auch in Reis (Mustroph et al., 2010; Locke et al., 2017) und Mais (Locke et al., 2017; Campbell et al., 2015), was eine wichtige und konservierte Funktion für die Anpassung unter Sauerstoffmangel suggeriert. *AtLBD41* ist sehr nah mit *AtLBD40* und *AtLBD42* verwandt, wobei *AtLBD40* ebenfalls durch Hypoxie induziert wird, wenn auch in geringerem Maße als *AtLBD41*. Für *AtLBD42* konnte jedoch keine Induktion bei Sauerstoffmangel beobachtet werden (Branco-Price et al., 2008; Mustroph et al., 2009).

1.6.3 AtLBD41 als putativer Repressor der Transkription

Mit Ausnahme von AtLBD39 wurde für alle Mitglieder der Klasse II LBDs eine C-terminale *ERF-associated amphiphilic repression* (EAR)-Domäne annotiert (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009). Dieses Motiv mit der Konsensus-Sequenz $^{LAbb}/_F DLN^L/_F(x)P$ ist essentiell für die inhibierenden Eigenschaften aktiver Repressoren (Ohta et al., 2001). Folglich wird angenommen, dass auch AtLBD41 als Repressor fungiert. Interessanterweise besitzen orthologe LBDs aus anderen Arten wie Reis oder Pappel ebenfalls ein EAR-Motiv (Kagale et al., 2010). Zudem wurde für AtLBD37 und AtLBD41 gezeigt, dass diese mit TOPLESS (TPL) und TOPLESS related (TPR) Proteinen interagieren (Causier et al., 2012), wobei diese Interaktion höchstwahrscheinlich über die EAR-Domäne erfolgt (Kagale & Rozwadowski, 2011; Causier et al., 2012; Ke et al., 2015; Martin-Arevalillo et al., 2017). TPL/TPR sind vorherrschende Co-Repressoren der Transkription, die mit zahlreichen TFs interagieren. Eine Fehlfunktion hat multiple Auswirkungen in der Pflanze zur Folge, wie etwa eine Fusion der Kotyledonen oder die Ausbildung einer zweiten Wurzel anstelle des Sprosses in *tpl-1* (Long et al., 2002; Long et al., 2006). Es ist davon auszugehen, dass TPL/TPR Histon-Deacetylasen rekrutieren, welche die Chromatinstruktur verändern und die Transkription inhibieren (Long et al., 2006; Krogan et al., 2012).

1.6.4 AtLBD41 als mögliches SUMO-Substrat

Darüber hinaus wurde AtLBD41 bei einer proteomweiten Suche als potentiell *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) Substrat identifiziert (Elrouby & Coupland, 2010). Im Rahmen der Studie konnte eine Interaktion von AtLBD41 mit dem SUMO-konjugierenden Enzym SCE1 sowie der SUMO Protease EARLY IN SHORT DAYS4 (ESD4) nachgewiesen werden. Zudem konnte in einem *in vitro* SUMO-Assay, in welchem alle Komponenten des SUMO-Konjugationsmechanismus in *E. coli* exprimiert werden und eine Anheftung von SUMO dann in der Bakterienzelle stattfindet, eine SUMOylierung von AtLBD41 durch die beiden Isoformen AtSUMO1 und AtSUMO3 gezeigt werden (Elrouby & Coupland, 2010).

SUMO ist ein 11 kDa großes Protein und kann posttranslational mit Substratproteinen verknüpft werden, um deren Proteinaktivität durch Regulation der subzellulären Lokalisation, Proteininstabilität und Protein-Protein Interaktionen zu modulieren (Wilkinson & Henley, 2010). Arabidopsis codiert insgesamt 8 SUMO Isoformen, wovon lediglich AtSUMO1, AtSUMO2, AtSUMO3 und AtSUMO5 exprimiert werden (Novatchkova et al., 2012; Hammoudi et al., 2016; Benlloch & Lois, 2018). AtSUMO1 und AtSUMO2 weisen dabei die höchste Expression sowie Verwandtschaft auf und eine Inaktivierung beider ist Embryo-lethal (Saracco et al., 2007; Castaño-Miquel et al., 2011).

Die kovalente Anheftung von SUMO an sein Substrat erfolgt mechanistisch ähnlich zu Ubiquitin und wird durch folgende enzymatische Schritte katalysiert (Kerscher et al., 2006): Das unreife SUMO Präkursor-Protein wird von einer SUMO-spezifischen Isopeptidase prozessiert, wodurch ein C-terminales

Diglycin Motiv exponiert wird. Anschließend wird SUMO durch die SUMO-aktivierenden Enzyme SAE1/2 in einer ATP-abhängigen Reaktion an seinem C-Terminus aktiviert, indem eine Thioesterbindung zwischen einem Cystein Rest von SAE2 und dem exponierten Glycin gebildet wird. Das aktivierte SUMO wird dann auf einen Cysteinrest von SCE1 übertragen, welches es mit Hilfe der SUMO-Ligase E3 auf das potentielle Substrat transferiert (Park et al., 2011). Mögliche SUMO-Bindestellen befinden sich in der Regel in dem Konsensusmotiv Ψ -K-x-D/E, wobei Ψ eine hydrophobe Aminosäure darstellt, K das Lysin ist, an welches SUMO über das C-terminale Glycin bindet und D/E entweder Aspartat oder Glutamat sind (Bernier-Villamor et al., 2002; Dohmen, 2004; Park et al., 2011). SUMOylierung ist eine reversible Modifikation und konjugiertes SUMO kann durch spezifische Proteasen wieder dekonjugiert werden (Yates et al., 2016).

Es wurde gezeigt, dass SUMO auch nicht-kovalent an andere Proteine binden kann, sofern diese ein SUMO-interagierendes Motiv (SIM) in ihrer Proteinsequenz enthalten. Das SIM enthält eine hydrophobe Kernsequenz aus den Aminosäureresten Leucin, Valin und/oder Isoleucin sowie den sauren Aminosäureresten Glutamat, Aspartat und/oder phosphoryliertem Serin und Threonin (Hecker et al., 2006; Kerscher, 2007).

In Arabidopsis gibt es mindestens 1000 potentielle SUMO-Substrate (Rytz et al., 2018). Daher ist es kaum verwunderlich, dass die Konsequenzen der Modifikation ähnlich vielfältig ausfallen. Es wurden SUMO-Substrate identifiziert, die in verschiedene Stressantworten (z.B. Hitze, Salzstress, Pathogeninfektion) oder in die Entwicklung involviert sind (Miura et al., 2007a; Castro et al., 2012). Die exakten molekularen Mechanismen, die diesen Antworten zugrunde liegen, sind jedoch immer noch unklar (Elrouby, 2017; Verma et al., 2018). Demnach ist es von großem Interesse, AtLBD41 als potentielles SUMO-Substrat in Verbindung mit Sauerstoffmangel zu analysieren.

1.7 Weitere Substrate des *Arg/N-degron pathways* in Pflanzen

Das Arabidopsis-Genom besteht aus 246 Proteinen, welche mit den Aminosäuren Methionin und Cystein beginnen und daher ein potentielles Ziel für den Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* darstellen (Dissmeyer, 2019). Es ist jedoch unklar, wie viele Proteine letztendlich wirklich Substrate der Methionin Aminopeptidasen, gefolgt von Oxidation, Arginylierung und Ubiquitinierung sind. Bislang wurden neben den GVIIFERFs lediglich zwei weitere Substrate des *Arg/N-degron pathways* identifiziert und charakterisiert: VERNALISATION2 (VRN2) (Gibbs et al., 2018) sowie LITTLE ZIPPER 2 (ZPR2) (Weits et al., 2019).

VRN2 ist eine Komponente des gut untersuchten *Polycomb Repressive Complex2* (PRC2). Während des Vorgangs der Vernalisation, der Induktion des Blühens durch eine längere Kälteeinwirkung, methyliert

und damit inaktiviert VRN2-PRC2 den Repressor der Blühinduktion FLOWERING LOCUS C (FLC). Es konnte nun gezeigt werden, dass die Stabilität von VRN2 aufgrund eines hoch konservierten N-terminalen Cys2 Restes durch den *Arg/N-degron pathway* gesteuert wird (Gibbs et al., 2018). Diese post-translationalen Regulation führt dazu, dass VRN2 unter aeroben und nicht-vernalisierenden Bedingungen lediglich in Spross- und Wurzelmeristem exprimiert wird, bei Hypoxie und Kälte hingegen in der gesamten Pflanze akkumuliert. Dieses Beispiel zeigt demnach eine Verbindung zwischen externer Sauerstoffverfügbarkeit und der epigenetischen Kontrolle der Pflanzenentwicklung auf.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff auch als regulatorisches Signal im Sprossapikalmeristem wirkt. LITTLE ZIPPER 2 (ZPR2) unterliegt bei normoxischen Bedingung einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway*. In der sauerstoffarmen Nische des Sprossapikalmeristems ist ZPR2 jedoch aktiv und inhibiert die Aktivität der Klasse-III der Homöodomänen-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren, wodurch die Aktivität des Meristems und damit auch die Ausbildung neuer Blätter sauerstoffabhängig reguliert wird (Weits et al., 2019).

1.8 ABA-Signalgebung und Verbindung zum *Arg/N-degron pathway*

Abscisinsäure (ABA) gilt im Allgemeinen als Phytohormon mit hemmender Wirkung. Im Antagonismus mit Gibberellinsäure (GA) reguliert ABA eine Vielzahl von Entwicklungsvorgängen wie Samenruhe, Keimung, Zellteilung oder Blühinduktion (Finkelstein et al., 2002; Cutler et al., 2010). Darüber hinaus spielt ABA in Antworten auf diverse abiotische sowie biotische Stresssituationen eine zentrale Rolle. Trocken-, Salz- und Kältestress, welche zu einer verminderten Wasserverfügbarkeit führen, induzieren die Synthese von ABA, wodurch unter anderem eine Änderung der Genexpression und ein Schließen der Stomata herbeigeführt wird (Busk & Pagès, 1998; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Viele der durch Trockenheit induzierbaren Gene werden demnach auch durch ABA reguliert (Abe et al., 2003). Aber auch bei Verwundung oder der Antwort auf Pathogene ist ABA involviert (Ton et al., 2009).

ABA wird in der Zelle von einer Gruppe cytosolischer ABA-Rezeptoren wahrgenommen: PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1), PYR1-LIKE (PYL) bzw. REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR (RCAR) (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). In Abwesenheit von ABA interagieren spezifische Protein-Phosphorylasen (PP)2C mit *Sucrose non-fermenting 1-related protein kinases 2* (SnRK2s). Sobald die Konzentration an ABA steigt und ABA an die Rezeptoren bindet, verändern diese ihre Konformation und interagieren mit PP2Cs (Melcher et al., 2009). Im Zuge dessen werden die SNRK2s aktiviert und können ihre Substrate phosphorylieren, darunter ABA-RESPONSIVE ELEMENT (ABRE) BINDING Proteine (AREBs), ABRE BINDING FACTORS (ABFs) und einige weitere Membranproteine, um die ABA-responsive Genexpression zu induzieren bzw. die Stomata zu schließen (Cutler et al., 2010).

Interessanterweise existieren vor allem in Bezug auf Keimung und Keimlingsetablierung Verbindungen zwischen dem *Arg/N-degron pathway* und der ABA-Signalgebung (Zhang et al., 2018). Es wurde gezeigt, dass Mutationen in wichtigen Komponenten des *Arg/N-degron pathways* in Arabidopsis eine veränderte ABA-Sensitivität nach sich ziehen (Holman et al., 2009; Gibbs et al., 2014). Dazu zählen die Mutante *greening after extended darkness 1 (ged1)*, welche eine Mutation in *PRT6* besitzt (Riber et al., 2015), sowie *prt6-1* und die Doppelmutante *ate1ate2*, welche eine ABA-Hypersensitivität in Bezug auf die Keimung aufwies (Holman et al., 2009). Darüber hinaus werden in *ged1* bereits unter Kontrollbedingungen ABA-responsiven Gene herunterreguliert (Choy et al., 2008; Riber et al., 2015). In Übereinstimmung mit der Schlussfolgerung, dass eine Stabilisierung der GVIERFs zur Induktion von ABA-responsiven Genen führt, konnte ein Hauptregulator der ABA Antwort, *ABA INSENSITIVE 5 (ABI5)*, mittels Chromatinimmunopräzipitation und Transaktivierungsstudien als Zielgen von RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12 identifiziert werden (Gibbs et al., 2014).

Auch in Reis konnten Zusammenhänge zwischen den GVIERFs und ABA gezeigt werden. Während der Überflutung sinken die ABA-Gehalte in der Pflanze (Fukao & Bailey-Serres, 2008). Eine Induktion von *SUB1-A1* bei Überflutung führt jedoch zu einer verstärkten ABA-Antwort und Expression Trockenstress-responsiver Gene. Zudem werden durch *SUB1-A1* Enzyme zur Neutralisierung von oxidativem Stress induziert, weshalb sich *SUB1-A1*-Reis schneller von Trockenstress nach Überflutungsereignissen erholt (Fukao et al., 2011).

1.9 Der Transkriptionsfaktor ABR1/ATERF#111

Aufgrund der Verbindung zwischen dem *Arg/N-degron pathway* und der ABA-Signalgebung wurden die Annotationen aller Gene aus Arabidopsis, die mit einem N-terminalen Met-Cys Motiv beginnen und daher potentielle Substrate des *Arg/N-degron pathways* darstellen, hinsichtlich einer Involvierung in die ABA-Antwort untersucht. In diesem Zusammenhang wurde der Transkriptionsfaktor AtERF#111, ABSCISIC ACID REPRESSOR 1 (ABR1) entdeckt. AtERF#111 ist eines von insgesamt acht Mitgliedern der Subgruppe X der AP2/ERF Familie (Nakano et al., 2006).

In Arabidopsis gibt es insgesamt 122 ERF Gene, die in zwölf Subgruppen unterteilt werden (I- X, VI-L und Xb-L) (Nakano et al., 2006). Obwohl das Akronym ERF beibehalten wurde, sind nicht alle Mitglieder der Family Ethylen-responsiv (Licausi et al., 2013). Charakteristisch für alle Mitglieder ist jedoch eine 60 - 70 Aminosäuren lange APETALA2 (AP2) Domäne, welche die DNA-Bindung vermittelt (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). In Reaktion auf Umwelteinflüsse und Hormone vermitteln AP2 Transkriptionsfaktoren hauptsächlich Wachstums-, Entwicklungs- sowie Stressantworten in der Pflanze und werden sowohl transkriptionell als auch posttranslational reguliert (Dietz et al., 2010; Mizoi et al., 2012; Licausi et al., 2013; Chandler, 2018).

Für AtERF#111 wurde suggeriert, dass der GXERF in die ABA-Signalgebung involviert ist und durch Trockenstress induziert wird (Pandey et al., 2005; Ha et al., 2014). Die Versuche von Pandey et al. (2005) basierten dabei maßgeblich auf Versuchen mit zwei *erf#111* T-DNA Insertionslinien im genetischen Hintergrund von Columbia (Col-0). Es wurde gezeigt, dass *erf#111* eine hypersensitive ABA-Antwort bezüglich Keimung und Wurzelwachstum aufwies (Pandey et al., 2005). Zudem wurde die Expression von *AtERF#111* neben Kälte-, Salz- und Trockenstress auch durch die Applikation von ABA induziert. Das Transkript ausgewählter ABA-Markergene war dabei in *erf#111* im Vergleich zu Col-0 merklich erhöht (Pandey et al., 2005).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *AtERF#111* auch in Verbindung mit Sauerstoffmangel reguliert wird und die Expression sowohl durch Hypoxie (Tsai et al., 2014) als auch Überflutung in Dunkelheit induziert wird (Tsai et al., 2014; van Veen et al., 2016; Yeung et al., 2018). Ob die Stabilität des Transkriptionsfaktors nun durch den *Arg/N-degron pathway* reguliert wird, war jedoch nicht bekannt und Teil der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren sind Informationen über die Expression von *AtERF#111* bei verschiedenen Bedingungen sehr limitiert, da dessen Sequenz nicht auf dem weit verbreiteten Affymetrix ATH1 Microarray Chip enthalten ist.

1.10 Zielsetzung

Neben den GVIERFs wurden bislang nur ZPR2 und VRN2 identifiziert, deren Stabilität in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit durch den *Arg/N-degron pathway* reguliert wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor AtERF#111, welcher ebenfalls mit den Aminosäuren Methionin und Cystein initiiert, einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* unterliegt. Ferner sollte eine Funktion von AtERF#111 als ABA Repressor überprüft werden. Um den Transkriptionsfaktor weiterführend zu charakterisieren, sollte analysiert werden, inwiefern eine Überexpression von *AtERF#111* das Transkriptom der Pflanze modifiziert. Durch die Identifikation von Zielgenen, welche durch den TF reguliert werden, sollten so Rückschlüsse auf die Funktion von AtERF#111 gezogen werden, sei es als Ziel des sauerstoffabhängigen Abbaus durch den *Arg/N-degron pathway*, als ABA Repressor oder in einem völlig neuen Zusammenhang.

Der Transkriptionsfaktor AtLBD41 ist Teil einer konservierten Hypoxieantwort, dessen Expression sehr stark durch Sauerstoffmangel induziert wird. Dennoch ist die Funktion von AtLBD41 völlig ungeklärt. Ziel der Arbeit war es daher zu entschlüsseln, welche Rolle AtLBD41 als potentieller Repressor in der pflanzlichen Antwort auf Sauerstoffmangel einnimmt. Dazu sollten Zielgene von AtLBD41 mittels Mikroarrayanalyse identifiziert werden und auch eine mögliche SUMOylierung des Transkriptionsfaktors näher betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen analytischen Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bezogen. Genspezifische Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Enzyme stammten von der Firma Thermo Fisher Scientific oder New England BioLabs Inc. (Frankfurt, Deutschland). Für Versuche und Medien verwendetes Wasser wurde mit einer Advantage A10 Milli-Q-Anlage (Merck Millipore, Billerica, USA) deionisiert.

2.2 Bakterienstämme

Für die Transformation von Tabak wurden kompetente *Agrobacterium tumefaciens* Bakterien des Stamms GV3101 verwendet (Koncz et al., 1984). Als sogenannter p19-Helferstamm wurde der *A. tumefaciens* Stamm 19K verwendet, der das virale Gen p19 exprimiert (Voinnet et al., 2003). Für die Selektion und Transformation von Plasmiden wurden die kompetenten *E. coli* Bakterien der Stämme DH10 β (Grant et al., 1990) und DB 3.1 (Bernard & Couturier, 1992) verwendet.

2.3 Bezogenes Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana (Arabidopsis) Ökotyp Columbia (Col-0) wurde als Wildtyp (WT) verwendet. Die *ABR1/AtERF#111* (AT5G64750) und *AtLBD41* (AT3G02550) Transfer-DNA (T-DNA) Insertionsmutanten *abr1-1/erf#111-1* (SALK_094151C), *abr1-2/erf#111-2* (SALK_012151C) sowie *lbd41* (SALK_144556) wurden beim *Nottingham Arabidopsis Stock Center* bestellt. Samen der T-DNA Linie *prt6-1* (SAIL_1278_H11) wurden von Julia Bailey-Serres bezogen. Samen der Quadrupelmutante *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* wurden von Sean Cutler zur Verfügung gestellt (Park et al., 2009).

2.4 Bedingungen für die Pflanzenanzucht

Die Samen wurden in der Regel zunächst sterilisiert. Bei der Flüssigmethode wurden die Samen für 10 min mit 70 % (v/v) Ethanol überschichtet, dann 10 min in 10 ml H₂O, 400 μ l Natriumhypochlorid und 8 μ l Triton X-100 sterilisiert und abschließend mit H₂O gewaschen. Bei der Trockenmethode wurden die Samen für 45 min mit Chlorgas (10 ml Natriumhypochlorid und 5 ml 37%ige Salzsäure) in einem Exsikkator oberflächensterilisiert. Die sterilisierten Samen wurden auf MS-Agarplatten (nach Murashige und Skoog, 1962: 4,4 g/l MS-Salze, 10 g/l Saccharose, pH 5,7 mit KOH, 10 g/l Plant Agar) ausplattiert und für 2-4 Tage in Dunkelheit bei 4 °C stratifiziert. Die Inkubation der Platten erfolgte

dann für den entsprechenden Zeitraum unter Langtagbedingungen (LT; 23 °C, Licht/Dunkel= 16h/8h, 100 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}^{-1}$). Für eine weitere Anzucht der Keimlinge auf Erde stand neben der Langtagklimakammer auch eine Kurztagklimakammer (KT; 23 °C, Licht/Dunkel= 8h/16h, 100 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\text{s}^{-1}$) zur Verfügung. Für die Pflanzenanzucht wurde Pikiererde (Okohum, Herberingen, Deutschland), Einheitspflanzererde des Typs GS90 grobR (Einheitserde Werkverband, Sinntal-Jossa, Deutschland) sowie Vermiculit (Deutsche Vermiculite Dämmstoff GmbH, Sprockhoevel, Deutschland) in einem Verhältnis von 3:3:1 gemischt und 2 h bei 80 °C pasteurisiert. Für Überflutungsexperimente wurde die Erde anschließend im Verhältnis 2:1 mit Sand vermischt. Für Protoplastenexperimente wurden unsterilisierte Samen direkt auf Erde ausgebracht, stratifiziert und für 3-4 Wochen im KT inkubiert.

2.5 Verwendete Antibiotika

Zur Selektion transgener Pflanzenlinien oder transformierter Bakterienstämme wurden die Wachstumsmedien mit entsprechenden Antibiotika versetzt (Tab. 1).

Tab. 1 | Antibiotika/Herbizide und deren verwendete Konzentrationen.

	Hersteller	Bestell-Nr.	Finale Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Lösemittel (Stocklösung 1000x)
Antibiotikum				
Ampicillin	Carl Roth	K029.1	100	H ₂ O
Chloramphenicol	Sigma Aldrich	C0378	50	Ethanol
Hygromycin	Carl Roth	CP13.3	50	H ₂ O
Kanamycin	Duchefa	K0126	50	H ₂ O
Rifampicin	Duchefa	R0146	50	DMSO
Spektinomycin	Duchefa	S0188	300	H ₂ O
Herbizid				
Phosphinotricin	Duchefa	P0159	10	H ₂ O

2.6 Molekularbiologische Standardmethoden

2.6.1 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzengewebe

Zur Extraktion von genomischer DNA (gDNA) wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe einer Kugelmühle (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) fein gemahlen. Anschließend wurden pro Eppendorfgefäß 500 μl Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA (pH 8), 0,2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)) zugegeben, gevortext und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin mit 500 μl einer 24:1 Mischung Chloroform:Isoamylalkohol versetzt und nach erneutem Vortexen zentrifugiert (10 min, 12000 g, Raumtemperatur (RT)). Der Über-

stand wurde abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 500 µl Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (15 min, 12000 g, RT). Zuletzt wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 20-50 µl Wasser resuspendiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.2 Isolation von RNA und reverse Transkription in cDNA

Pflanzenmaterial wurde in gefrorenem Zustand in der Kugelmühle fein gemahlen. Für Mikroarrayexperimente wurde stets die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Für alle weiteren Experimente wurde wie folgt vorgegangen. Zunächst wurde das pulverisierte Pflanzenmaterial mit 500 µl TRIsure (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) versetzt und für 1 min gevortext. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde erneut gevortext, 100 µl Chloroform zugegeben, für 20 s geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Für die RNA-Extraktion aus Protoplasten wurde dabei analog vorgegangen, nur dass das Protoplastenpellett mit 400 µl TRIsure versetzt wurde und zwei technische Replikate zu einem Ansatz von 800 µl vereint wurden. Anschließend wurden 160 µl Chloroform hinzugegeben.

Nach Zentrifugation (15 min, 13000 g, 4 °C) wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol versetzt. Die Gefäße wurden 6-mal invertiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (10 min, 13000 g, 4 °C), der Überstand entfernt und das Pellet mit 750 µl 75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (5 min, 5300 g, 4 °C) wurde der Überstand vollständig entfernt. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 20-50 µl H₂O gelöst, für 10 min bei 60 °C inkubiert und die Konzentration an einem Nanophotometer (IMPLEN GmbH, München, Deutschland) bestimmt.

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden jeweils 2 µg RNA sowie 100 pmol Oligo(dT)₁₅ eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde nach Herstellerangaben mittels RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase durchgeführt (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Der Ansatz wurde 60 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei 4 °C gelagert.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide befinden sich im Anhang (Tab. A1).

2.6.3.1 Semiquantitative RT-, Kolonie- und Phusion-PCR

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Als Matrize dienten dabei cDNA, gDNA, Plasmid-DNA oder Zellmaterial aus einer Bakterienkolonie.

Für die semiquantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) sowie die Kolonie-PCR wurde Taq-Polymerase (hergestellt am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth) verwendet. Hierbei wurden 2,5 µl 10xPCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris (pH 9), 0, 1 % (v/v) Triton X-

100), je 0,5 µl *forward* und *reverse* Oligonukleotid, 0,5 µl dNTP (40 mM), 1 µl Matrizen-DNA sowie 0,25 µl Taq-Polymerase vermischt und mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm lautete wie folgt: Schritt 1: 94 °C, 2 min; Schritt 2: 94 °C, 30 s; Schritt 3: 54 °C, 30 s; Schritt 4: 72 °C, 1 min/kb; Schritt 5: X-fache Wiederholung der Schritte 2-4; Schritt 6: 72 °C 5 min, Schritt 7: 14 °C, ∞. Im Falle der Kolonie-PCR wurde die initiale Denaturierungszeit auf 5 min erhöht.

Für Sequenzierungen oder Klonierungen wurde zur Amplifikation die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Hierbei wurden 10 µl 5xHF-Puffer mit je 1 µl *forward* und *reverse* Oligonukleotid, 1 µl dNTP (40 mM), 1 µl Matrizen-DNA sowie 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase vermischt und mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm lautete wie folgt: Schritt 1: 98 °C, 1min; Schritt 2: 98 °C, 30 s; Schritt 3: T_m + 3 °C, 30 s; Schritt 4: 72 °C, 1 min/kb; Schritt 5: 38-fache Wiederholung der Schritte 2-4; Schritt 6: 72 °C, 5 min; Schritt 7: 14 °C, ∞.

2.6.3.2 Zielgerichtete Mutagenese-PCR

Die zielgerichtete Mutagenese-PCR diente zur Generierung von Punktmutationen (Zheng et al., 2004). Zu diesem Zweck wurden Oligonukleotide verwendet, welche in der Mitte ihrer Sequenz die gewünschte Punktmutation enthielten. Anschließend erfolgte eine Phusion-PCR (s. 2.6.3.1). Als Template dienten 5 ng Plasmid DNA (pDONRTM221 + wildtypisches Insert, das mutiert werden sollte), die Zyklenzahl wurde auf 12 reduziert. Zusätzlich wurden dem Ansatz 2,5 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Das PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt (s. 2.6.5), für 2 h mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut (s. 2.6.5) und die Reaktion für 20 min bei 80 °C abgestoppt. Da DpnI methylierungssensitiv ist, wurde auf diese Weise nur der ursprünglich isolierte Vektor (Matrize) verdaut, nicht aber der neu amplifizierte Vektor. Es wurden 5 µl des Ansatzes in *E. coli* DH10β transformiert (s. 2.6.8) und einzelne Kolonien in flüssigem LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl) angezogen. Anschließend wurde das Plasmid erneut isoliert (s. 2.6.9) und durch Sequenzierung (s. 2.17) die Punktmutation überprüft.

2.6.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative *Real-Time*-PCR (RT-qPCR) wurde das CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) verwendet. Die cDNA (s. 2.6.2) wurde zunächst 50-fach verdünnt. Pro Ansatz wurden zu 2,5 µl cDNA, 2,5 µl Oligonukleotide (0,5 µM *forward* + 0,5 µM *reverse* Oligonukleotid) sowie 5 µl iQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) zugegeben. Die 96-Well Mikrotiterplatte wurde mit zugehörigem Microseal ,B'-Film versiegelt. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet: Initiale Denaturierung: 95 °C, 3 min; 2-Schritt Programm für 40 Zyklen: 95 °C, 10 s gefolgt von 60 °C, 40 s; abschließend folgten 95 °C, 10 s; um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wurde die Temperatur

im Ansatz von 65 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten für je 5 s erhöht. Es wurden drei biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten vermessen. Das relative Transkriptlevel (RTL) wurde durch die Gleichung $2^{-\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) bestimmt und auf die Expression der Referenzgene *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* oder *SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A)* normalisiert.

2.6.4 Agarosegelelektrophorese

Amplifizierte RNA- bzw. DNA-Stränge wurden mit 6xDNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) versetzt und elektrophoretisch in einem eindimensionalen Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure), 20 min bei 100 - 120 V). Pro 50 ml Gelvolumen wurde 1 µl des Färbestoffes SERVA DNA STAIN G (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zugesetzt. Als Referenz der Fragmentgröße wurde GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet. Mit Hilfe von UV-Licht wurden die Banden in der Geldokumentationsanlage (312 nm; INTAS, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) visualisiert.

2.6.5 DNA-Restriktionsverdau und Aufreinigung

Beim Restriktionsverdau von DNA wurde dieser nach Herstellerangaben der Firmen Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) oder New England BioLabs (Ipswich, MA, USA) durchgeführt. Nach Inkubation des Restriktionsansatzes für mindestens 2 h bei 37 °C wurden die DNA-Fragmente entweder direkt oder nach elektrophoretischer Auftrennung und Ausscheiden aus dem Agarosegel mittels GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt (s. 2.6.4).

2.6.6 Ligation

Zur Insertion von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA wurde eine Ligation durchgeführt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 20-100 ng linearisierter Vektor-DNA, die fünffache Menge an Insert-DNA im Verhältnis zu eingesetzter Vektor-DNA sowie 2 µl 10x T4-DNA Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte über Nacht bei RT. Anschließend wurden 2 µl des Ansatzes in 50 µl kompetente *E. coli* DH10β Zellen transformiert (s. 2.6.8).

2.6.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. Coli* Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer zuvor angesetzten Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) bis zu einer optischen

Dichte bei 600nm (OD_{600}) von 0,4 - 0,6 angezogen. Die Zellkultur wurde in 50 ml Kulturen aufgeteilt, für 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 4000 *g* zentrifugiert. Die Pellets wurden in 10 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und für 5 min bei 2000 *g* zentrifugiert. Abschließend wurden die Pellets in jeweils 2 ml 100 mM $CaCl_2$ mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert, 30 min auf Eis gelagert und in 100 μ l Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Präparation chemisch kompetenter *A. tumefaciens* Zellen wurden 50 ml YEB-Medium (1 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose, 0,5 g/l $MgSO_4$) mit 2 ml einer zuvor angesetzten Übernachtskultur angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,5 - 0,8 erreicht wurde. Zur Selektion des Stammes GV3101 wurde dem Medium 50 μ g/ml Rifampicin zugefügt. Anschließend wurden Zellen bei 3000 *g* für 5 min bei 4 °C pelletiert, das Pellet in eiskalter 20 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und in 100 μ l Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.6.8 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 μ l der Zellen mit 0,1 - 2 μ l Plasmid vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 1 min bei 42 °C. Nach erneutem Abkühlen auf Eis wurden 800 μ l flüssiges LB-Medium zum Ansatz pipettiert und dieser 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde bei 2000 *g* für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 μ l abgenommen, das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert und die Suspension auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurden, ausplattiert.

2.6.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen mit einem Volumen von 3 - 10 ml wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Aufreinigung großer Übernachtskulturen mit einem Volumen von 200 bis 400 ml wurde das Nucleo Bond PC500 Plasmid Midi Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet.

2.6.10 Transformation von *A. tumefaciens*

Zur Transformation wurden kompetente Zellen von *A. tumefaciens* GV3101 auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 8 μ l Plasmid mit 400 μ l kompetenten Zellen vermischt und 5 min auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff und schließlich 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 800 μ l YEB-Medium wurden die Zellen 2-4 h bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde für 1 min bei 1500 *g* zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 μ l abgenommen. Im Rest wurde das Pellet resuspendiert, auf YEB-Plat-

ten (für festes Medium: 15 g/l Plant Agar) mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für 2 d bei 28 °C inkubiert.

2.6.11 Transiente Tabak-Transformation mit *A. tumefaciens*

Zunächst wurde eine 3 ml Kultur mit Agrobakterien, die das gewünschte Plasmid enthalten, in YEB Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln (ca. 180 rpm) inkubiert. Mit 500 µl der Übernachtskultur wurde anschließend eine 50 ml Hauptkultur angeimpft, mit 500 µl 1 M MES sowie 10 µl Acetosyringone (19,62 mg/ml DMSO) versetzt und erneut über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert.

Im Rahmen der Tabak-Infiltration für die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurden die Kulturen anschließend auf eine OD₆₀₀ von 1,5 eingestellt. Der p19-Helferstamm hingegen wurde auf eine OD₆₀₀ von 1,8 eingestellt. 15 ml Kultur des p19-Helferstamms, 15 ml Kultur des HA-SUMO1 Konstrukts und 15 ml Kultur des zu untersuchenden Konstrukts wurden zusammengeführt und zentrifugiert (30 min, 3500 g, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 36 ml Infiltrationspuffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 10 µM Acetosyringone) resuspendiert.

Zum Zweck der konfokalen Analysen von transient transformierten Tabakblättern wurde die 50 ml Kultur nach Inkubation über Nacht zentrifugiert (2400 g, 20 min, 4 °C), mit H₂O gewaschen und erneut zentrifugiert (2400 g, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde in Infiltrationspuffer aufgenommen und für Agrobakterien mit dem Plasmid von Interesse eine OD₆₀₀ von 1,5 eingestellt. Für den Helferstamm wurde eine OD₆₀₀ von 1,8 eingestellt und diese im Verhältnis 2:1 (Plasmid: Helferstamm) gemischt.

Die Infiltrationssuspensionen wurden für 2 h bei RT inkubiert. Abschließend wurden mit einer 1 ml Spritze (ohne Kanüle) die Blattunterseiten von 4-6 Wochen alten *Nicotiana benthamiana* infiltriert. Nach 3 Tagen Inkubation im Langtag wurde Blattmaterial für weitere Analysen geerntet.

2.6.12 Transformation von *Arabidopsis* durch *floral dip*

Zunächst wurde eine 3 ml Kultur mit Agrobakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Mit 500 µl der Übernachtskultur wurde anschließend eine 50 ml Hauptkultur (YEB + Antibiotika) angeimpft und erneut über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 g, 20 min, 4 °C) und die Pellets in 5 % (w/v) Saccharoselösung resuspendiert. Die Lösung wurde mit 0,2 % (v/v) Silwett-77 versetzt und die Pflanzen mit dem Blütenstand in die Agrobakteriensuspension getaucht (OD₆₀₀ ca. 0,8). Die Pflanzen wurden dann mit Folie umwickelt und über Nacht in Dunkelheit inkubiert. Nach 4 Wochen Wachstum im LT wurden die Samen geerntet und positive Transformanten anhand der Antibiotika-Resistenz selektiert. Homozygote Pflanzen konnten in der T3 Generation identifiziert werden.

2.6.13 Kreuzung von Arabidopsis Genotypen

Zur Kreuzung von Arabidopsis-Pflanzen wurden die Pflanzen zunächst für ca. zwei Wochen im KT angezogen und dann zur Blühinduktion in den LT transferiert. Bei den ca. fünf Wochen alten Pflanzen wurden geschlossene Blüten der Pollen-Empfängerpflanze ausgewählt, bei denen die weißen Kronblätter (Petalen) gerade zu sehen waren. Anschließend wurden vorsichtig Kelchblätter (Sepalen), Petalen und Staubblätter (Stamina) entfernt. Stamina mit reifen Staubbeuteln (Antheren) wurden aus offenen Blüten der Pollen-Donorpflanzen isoliert und auf die Narbe (Stigma) der Empfängerpflanze gestreift. Die Pflanzen wurden weiter im LT bis zur Samenreife inkubiert.

2.7 Verwendete Plasmide und Klonierungen

Eine Übersicht über alle verwendeten Ursprungsvektoren sowie der klonierten Derivate befindet sich im Anhang (Tab. A2).

2.7.1 Gateway-Klonierung und Generierung von Gateway-Entry Vektoren

Die Gateway-Klonierungstechnologie, welche auf der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen λ beruht, wurde nach Herstellerangaben angewandt (Invitrogen, Paisley, UK). Hierbei wurden die zu transformierenden Konstrukte zunächst in den Entry-Vektor pDONRTM221 kloniert und anschließend in einen Destination-Vektor rekombiniert, welcher das Transgen unter die Kontrolle eines *Cauliflower Mosaic Virus* 35S Promotors stellte.

Zur Erstellung von Entry-Vektoren der Gateway-Klonierung diente in der Regel cDNA als Matrize für kodierende Sequenzen oder gDNA als Matrize für den Promotorbereich. Bei der Klonierung von Konstrukten mit C-terminalem Epitop-Tag wurden *reverse* Oligonukleotide generiert, welche die Matrizen-DNA ohne C-terminales Stopcodon amplifizierten. Die Deletion der EAR-Domäne verschiedener LBD-Klasse II Mitglieder wurde durch eine Kombination an Oligonukleotiden realisiert, welche ein am C-Terminus verkürztes Genprodukt amplifizierten.

Bei der Klonierung von *AtERF#111* wurde in einem Entry-Konstrukt das N-terminale Methionin- und Cystein-Motiv erhalten, während in einem anderen Konstrukt die Aminosäure Cystein durch Alanin ausgetauscht wurde. Dies wurde durch ein *forward* Oligonukleotid realisiert, welches eine Mutation in das zweite Triplet der *AtERF#111*-kodierenden Sequenz einführte, wodurch Alanin anstelle von Cystein translatiert wurde.

2.7.2 Plasmide zur transienten Expression in Protoplasten

Als Reporterkonstrukt zur Normalisierung der Transformationseffizienz wurde bei der transienten Protoplastentransformation die für die Renilla Luciferase (rLUC) kodierende Sequenz durch Restriktion aus

dem Vektor *p70SRUC* (Stahl et al. 2004) in den Vektor *pBT10GAL4UAS* (Wehner et al. 2011) integriert (*pBT10-rLUC*). Dabei wurde die für Firefly Luciferase (fLUC) kodierende Sequenz entfernt.

Für die Analyse von Promotoren im Rahmen von Transaktivierungsassays wurden maximal 2000 bp der stromaufwärtsgelegenen Sequenz des jeweiligen Gens ab dem Startcodon ATG aus Col-0 gDNA mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, welche an 5' und 3' Ende Restriktionsschnittstellen anfügten. Die Produkte wurden mittels Restriktion mit den Enzymen BamH1 und Nco1 und anschließender Ligation in den Vektor *pBT10Gal4UAS* (Wehner et al. 2011) kloniert.

Zur Klonierung von Effektoren wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen in die *Gateway*-Vektoren *p35S:HA-GW* bzw. *p35S:GW-HA* (Ehlert et al. 2006) kloniert, je nachdem, ob eine N- bzw. C-terminale Fusion des HA-Tags gewünscht war. Das Konstrukt mit Grün fluoreszierendem Protein (GFP)-Tag *p35S:HA-GFP* wurde von Philipp Gasch kloniert (Klecker et al. 2014). Darüber hinaus wurde von Philipp Gasch das Konstrukt *pHBTL:GW:VP16-HA* zur Verfügung gestellt, welches den jeweiligen Effektor mit einem VP16-Aktivatorprotein aus *Herpes simplex* fusionierte.

Zur C-terminalen Fusion eines Glukokortikoidrezeptors wurden Entry-Klone (GFP diente hierbei als Kontrolle) in den *Gateway*-Vektor *p35S:rfa-HBD* (zur Verfügung gestellt von Monika Tomar) kloniert.

Zur Erstellung von Fusionskonstrukten von Transkriptionsfaktoren an die GAL4UAS Bindedomäne (BD) wurde der Vektor *p35S:GBD-GW* (Ehlert et al. 2006) verwendet. Das Fusionskonstrukt *p35S:BD-RAP2.2* wurde von Philipp Gasch kloniert.

2.7.3 Plasmide zur transienten Expression in *N. benthamiana* oder stabilen Expression in *A. thaliana*

Die binären *Gateway*-Zielvektoren *pMDC83-GFP* (Curtis und Grossniklaus, 2003), *p35S:HF-GATA* (Mustroph et al., 2010) und *pK7FWG2* (Karimi et al. 2002) dienten zur transienten Transformation von Tabakblättern sowie zur stabilen Transformation von Arabidopsis und der Fusion entsprechender Epitop-Tags. Bei der transienten Transformation von Tabak wurde zusätzlich das Helferplasmid p19 infiltriert (Voinnet et al., 2003).

Der Vektor *pK7FWG2* (Karimi et al. 2002) wurde von Willi Riber so modifiziert, dass eine N-terminale Fusion eines HA-Tags und gleichzeitig eine C-terminale Fusion eines GFP-Tags an eine Zielsequenz ermöglicht wurde. Zudem wurde aus *Kk7FWG2* in Kombination mit *p35S:GA-HA:VP16* (Philipp Gasch) das neue Fusionskonstrukt *pK7FWG2:VP16-HA* generiert - ein binärer *Gateway*-Vektor zur Fusion der VP16-Domäne.

Der *Gateway*-Vektor *pBGWL7* (Karimi et al. 2005) diente zur Herstellung stabiler LUC-Reporterlinien, wobei der Promotor von *AtERF#111* (1302 bp stromaufwärts vom ATG) durch das Prinzip der *Gateway*-Klonierung an die Firefly Luciferase kodierende Sequenz fusioniert wurde.

2.7.4 Generierung von Mutationen mittels CRISPR/Cas9

Zunächst wurden 24 Nukleotide lange *guide* RNA-Einzelstränge entworfen, welche Bsal Klonierungs-Überhänge besaßen und deren Zielsequenz sich direkt vor einer PAM-Sequenz (*Protospacer Adjacent Motif* – in diesem Fall NGG für *Streptococcus pyogenes* Cas9) befand. Zur Vorhersage genomweiter CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)/CRISPR-associated (Cas)9 Zielsequenzen wurde das online Tool *CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor* (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>, (Stemmer et al., 2015)) verwendet.

Die Oligonukleotide wurden zu 100 µM in H₂O gelöst und je 2 µl Plus- und Minusstrang vermischt, 5 min bei 65 °C inkubiert und dann zum *Annealing* 30 min bei RT abgekühlt. Zur Linearisierung der binären Pflanzenvektoren pKSE401 (Kanamycin-Resistenz in Pflanzen) (Xing et al., 2014) bzw. pHSE401 (Hygromycin-Resistenz in Pflanzen) (Xing et al., 2014) wurden diese mit dem Enzym Bsal verdaut (Herausschneiden der Spektinomycin-Resistenz) (s. 2.6.5) und der Ansatz anschließend für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde der linearisierte Vektor über eine Gelextraktion aufgereinigt (s. 2.6.5), mit den doppelsträngigen Fragmenten ligiert (s. 2.6.6) und in *E. coli* DH10β transformiert (s. 2.6.8). Nach Selektion und Bestätigung positiver Klone durch Sequenzierung (s. 2.17) wurde das Konstrukt in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert (s. 2.6.11) und anschließend mittels *floral dip* in *Arabidopsis* transformiert (s. 2.6.12).

2.8 Versuche mit Arabidopsis Protoplasten

2.8.1 Protoplastenisolation

Etwa 30 Rosettenblätter von 3 - 4 Wochen alten *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen, welche im KT angezogen wurden, wurden geerntet, in 1 mm dünne Streifen geschnitten und mit 5 ml Enzymlösung (500 mg Cellulase (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 219466; 10000 U/g), 100 mg Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande; > 3,000 U/g), 0,4 M Mannitol, 20 mM KCl, 20 mM MES, 10 mM CaCl₂, pH 5,7) überschichtet. Der Protoplastieransatz wurde dann für 4 h im Vakuum inkubiert, im Anschluss 5 min bei 300 rpm geschüttelt und durch ein Stahlnetz (63 µm) filtriert. Daraufhin wurden die Protoplasten bei 120 g für 2 min bei RT abzentrifugiert (Ausschwingrotor, Beschleunigung Stufe 3, Bremse Stufe 2) und der Überstand entfernt. Das Protoplastenpellet wurde anschließend vorsichtig in 5 ml W5-Lösung (2 mM MES, 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, pH 5,7) gewaschen und erneut zentrifugiert (diesmal nur für 1 min). Der Waschschrift wurde einmal wiederholt und das Protoplastenpellet abschließend in 5 ml MMg-Lösung (0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂, 4 mM MES, pH 5,7) resuspendiert. In der Regel betrug die Protoplastenkonzentration ca. 4 x 10⁴ Zellen/ml.

2.8.2 Protoplastentransformation und Behandlung mit CHX, DEX und MG132

Für Transaktivierungsassays wurden 200 µl Protoplastensuspension mit 4 µg des Reporterplasmids, 2 µg des Effektorplasmids sowie 0,5 µg des Normalisierungsplasmids transformiert. Dazu wurde die DNA zunächst in ein 2 ml Eppendorfgeläß vorgelegt und mit der Protoplastensuspension durch 5-maliges Invertieren vermischt. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 200 µl einer Polyethylenglycol-Lösung (40 % PEG₄₀₀₀, 0,4 M Mannitol, 0,2 M CaCl₂) hinzu pipettiert und 15-mal zügig invertiert. Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert und die Transformationsreaktion durch Zugabe von 800 µl W5-Lösung gestoppt. Nach anschließender Zentrifugation für 1 min bei 120 g und RT (Ausschwingrotor; Beschleunigung Stufe 4, Bremse Stufe 4) wurde der Überstand abgenommen und die Protoplasten in 300 µl WI-Lösung (4 mM MES 0,5 M Mannitol 20 mM KCl) resuspendiert. Der Ansatz wurde bis zum nächsten Tag im LT inkubiert.

Für den Glukokortikoid-induzierbaren Protoplastenassay gefolgt von einer Mikroarrayanalyse wurden 400 µl der Protoplastensuspension mit 20 µg der Glukokortikoidrezeptor-Fusionen (*35S:AtERF#111-HBD* oder *35S:GFP-HBD*) transformiert und für das weitere Protokoll alle Volumina verdoppelt. Demnach wurde der Ansatz letztendlich in 600 µl WI resuspendiert. Nach 18 h Inkubation im LT wurden die Proben mit 50 µM Cykloheximid (CHX) versetzt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, C7698) bzw. mit dem gleichen Volumen des Lösemittels DMSO. Nach 30 min der Inkubation mit CHX wurden 10 µM DEX (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, D4902) zugegeben und der Ansatz für weitere 4 h im LT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen bis zur RNA-Extraktion (s. 2.6.2) im flüssigen Stickstoff eingefroren.

Für die Versuche zur Proteinstabilität durch Western-Blot wurden 30 µg Plasmid-DNA in 600 µl Protoplastensuspension transformiert. Nach Inkubation über Nacht im LT wurde der Ansatz zu je 180 µl Aliquots aufgeteilt und mit 50 µM MG132 (UBP Bio, Aurora, USA, F1101) bzw. DMSO als Kontrollbehandlung versetzt. Für die Analysen nach 3 h wurden 100 µM CHX (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA, sc-3508) sofort nach Zugabe des Proteasominhibitors zugegeben. Für Analysen nach 1 h wurden die Proben 2 h später behandelt, sodass alle Proben zur selben Zeit nach einer weiteren Stunde durch Zentrifugation (200 g, 1 min, RT) geerntet wurden.

2.8.3 Proteinextraktion aus Protoplasten

Zur Proteinextraktion aus Protoplasten wurden die Protoplastenpellets in 116 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 20 mM NaF, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,5% (w/v) Deoxycholat, 10 mM Na₄P₂O₇, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1x cComplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Schweiz)) resuspendiert und für 15 min bei 68 °C mit 5x SDS-Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 250 mM DTT, 50 % (v/v) Glycerol, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) SDS) inkubiert.

2.8.4 Quantitative Luciferasemessung

Nach der Protoplastentransformation und Inkubation über Nacht im LT erfolgte die Bestimmung der Aktivität der Firefly Luciferase (fLUC) sowie der Renilla Luciferase (rLUC). Dazu wurden die Luciferase Assay Kits Beetle Juice BIG KIT und Renilla Juice BIG KIT (P.J.K GmbH, Kleinbittersdorf, Deutschland) gemäß Herstellerangaben verwendet. Der WI-Überstand wurde abgenommen und die Protoplasten mit 100 µl 1x Lysis-Juice2 (P.J.K GmbH, Kleinbittersdorf, Deutschland) durch Vortexen lysiert. Die Lichtemission von 20 µl Lysat, welchem 50 µl entsprechendes Substrat automatisch injiziert wurde, wurde mit Hilfe des GloMax 96 Microplate Luminometers (Promega, Fitchburg, WI, USA) mit einer Integrationszeit von 3 s vermessen. Anschließend wurde das Verhältnis von Firefly Luciferaseaktivität zu Renilla Luciferaseaktivität gebildet (fLUC/rLUC).

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Proteinextraktion aus Keimlingen

Zur Proteinextraktion aus 7 Tage alten Keimlingen wurde ca. 50 mg zerkleinertes Pflanzenmaterial mit 50 µl Extraktionspuffer (4 M Harnstoff, 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 10 % (w/v) SDS) versetzt und die Suspension für 10 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben für 5 min im Ultraschallbad behandelt, 15 min bei max. rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand für 1 min bei 95 °C mit 5x SDS-Probenpuffer inkubiert.

2.9.2 Proteinextraktion aus Tabak und Chromatin-Immunopräzipitation

Das gefrorene Pflanzenmaterial der infiltrierten Tabakblätter wurde mit dem Handmörser unter permanenter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert. 2 g des Pflanzenmaterials wurden dann im Mörser mit 5 ml eiskaltem Extraktionspuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5% (w/v) Triton X-100, 3 mM DTT, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche): 1 Tablette/ 25 ml Extraktionspuffer) versetzt, sodass das Pflanzenmaterial in dem Puffer auftaute. Die Probe wurde bei 4 °C und 950 rpm für 30 min geschüttelt und dann bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert (max rpm). Vom Überstand wurden 60 µl abgenommen und bei 4 °C gelagert (Input-Fraktion).

Der restliche Überstand wurde auf 20 µl Anti-GFP Beads Suspension (gekoppelt an NHS-aktivierte Sepharose 4 FF Beads (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)) gegeben und die Probe bei 4 °C über Nacht auf einem Rad gedreht. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C und 2500 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Es wurden 700 µl eiskalter Waschpuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5% (w/v) Triton X-100, 3 mM DTT) auf die Beads gegeben, vorsichtig vermischt und bei 4 °C und 2500 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift drei weitere Male wiederholt. Der 5xSDS Ladepuffer (50% (w/v) Glycerol, 10% (w/v) SDS, 0,25 M Tris-HCl pH 6,8) wurde 45 min bei 60 °C erwärmt (Umschlag milchig zu klar), 0,5 M DTT hinzugefügt, 5 sec

gevortext und 20 sec bei 95 °C erhitzt. 18 µl dieses 5x SDS Ladepuffers wurden zu 60 µl Input-Probe (für 2 Gele, 35 µl pro Gel) dazugegeben, vermischt und 3-5 min bei 95 °C inkubiert. 3x SDS Ladepuffer wurde mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzt, gevortext und 10 sec bei 95 °C inkubiert. 50 µl dieses 3x SDS Ladepuffers wurden auf eine GFP-Beads Probe gegeben (für 2 Gele, 25 µl pro Gel) 3-5 min bei 95 °C inkubiert und 3 min bei RT und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand, der die eluierten Proteine des GFP-Pulldown enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.9.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot

Das SDS-Gel setzte sich aus einem 5 %igen Sammelgel (2,75 ml H₂O, 0,65 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 % (w/v) /0,8 % (w/v)), 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8, 40 µl 10 % (w/v) SDS, 40 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) und einem 10 %igen Trenngel (2,37 ml H₂O, 2,01 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 % (w/v) /0,8 % (w/v)), 1,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 60 µl 10 % (w/v) SDS, 60 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat, 2,4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) zusammen. Als Größenstandard wurde bei jedem SDS-Gel PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet. Pro Gel wurden 7 µl PageRuler™ mit 18 µl 3xSDS-Ladepuffer homogenisiert, 10 s bei 95 °C inkubiert und aufgetragen. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte mit einem Bio-Rad System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) unter Verwendung eines Laufpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS). Für die ersten ca. 20 min wurde eine Spannung von 85 V verwendet. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 135 V erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte. Für den elektrophoretischen Transfer wurde eine Roti-Fluoro PVDF-Membran (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, welche zunächst 15 min in Methanol aktiviert, anschließend mit H₂O gewaschen und zusammen mit den Whatman-Filterpapieren in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 20% (v/v) Methanol) gewaschen wurde. Der Transfer erfolgte dann für 1 h bei 100 V mit Hilfe einer Mini-PROTEA Tetra Cell Apparatur (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) in Transferpuffer. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung proteinfreier Zonen über Nacht in 1xPBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1 % (v/v) Tween-20, pH 7,4) mit 5 % (w/v) Milchpulver bei 4 °C blockiert. Am nächsten Tag wurde zunächst dreifach mit 1xPBS-T Puffer gewaschen, 10 ml der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers (Tab. 2) in Blockierlösung zugegeben und für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreifach mit 1xPBS-T Puffer gewaschen und der sekundäre Antikörper (Tab. 2) in Blockierlösung zugegeben, 1 h bei RT inkubiert und erneut dreifach mit 1xPBS-T Puffer gewaschen.

Nach Zugabe des ECL Prime Western-Blot-Detektionsreagenz zur Membran nach Herstellerangaben (GE Healthcare, Chicago, USA; RPN2236) erfolgte die Detektion mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Detektors (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland). Eine gleichmäßige Bela-

dung der Banden des SDS-Gels mit Protein wurde entweder durch eine Ponceau-Färbung (0,2 % (w/v) Ponceau-S in 3 % (v/v) Essigsäure) oder durch eine Coomassie-Färbung (0,1 % Coomassie Blau R-250 in 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol und 40 % (v/v) H₂O) kontrolliert. Die Entfärbung erfolgte bei Ponceau-Rot mit kurzem Schwenken in Wasser, bei der Coomassie-Färbung durch 3-5 min Inkubation in Waschlösung (20 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure).

Tab. 2 | Verwendete Antikörper sowie deren Verdünnungen. Als primäre Antikörper wurden anti-HA und anti-GFP, als sekundärer Antikörper anti-Maus (markiert mit HRP = horseradish peroxidase) verwendet.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.	Verwendung
anti-HA (primär, aus Maus)	1:1000	Covance	MMS-101R	Western Blot Protoplasten
anti-HA (primär, aus Maus)	1:3000	Sigma-Aldrich	H9658	Western Blot Keimlinge/Co-IP
anti-GFP (primär, aus Maus)	1:3000	Sigma-Aldrich	11814460001	Western Blot Keim- linge/Co-IP
anti-Maus-HRP (sekundär)	1:5000	Carl Roth	4759-1	Western-Blot Co-IP
anti-Maus-HRP (sekundär)	1:10000	Carl Roth	4759-1	Western Blot Keimlinge
anti-Maus-HRP (sekundär)	1:5000	Pierce	31437	Western Blot Protoplasten

2.10 Stressbehandlungen

2.10.1 Hypoxie-Stress mit anschließender Transkriptanalyse

Für die Hypoxie-Behandlungen wurden 7 Tage-alte Keimlinge, die auf MS-Medium angezogen wurden, verwendet. Offene Petrischalen wurden für die angegebenen Zeitspannen in den Exsikkator gestellt und konstant mit 100 % Stickstoff begast.

Die Behandlungen erfolgten 2 h nach Beginn der Langtag-Photoperiode in Licht bzw. Dunkelheit. Für Wiederbelüftungen wurde der Deckel vom Exsikkator entfernt und die Keimlinge bei Normoxie unter den entsprechenden Bedingungen (Licht/Dunkel) weiter inkubiert. Kontrollen wurden für die gleiche Zeit in der gleichen Klimakammer an der Luft bei Licht bzw. in Dunkelheit inkubiert.

2.10.2 Hypoxie-Überlebensexperimente mit Keimlingen

Die Überlebensexperimente mit Keimlingen wurden von Jay Jethva am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen des Botanischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Keimlinge von Col-0 und *lbd40/41/42* wurden im Rahmen dieser Experimente auf ½ MS mit 0,2 % Saccharose für 7 Tage im Langtag (Licht/Dunkel= 16h/8h, 90 µmol Photonen/m²s⁻¹) bei 21 °C und 60 % Luftfeuchte angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge 16 h der Anoxie (0 % Sauerstoff)

in Dunkelheit ausgesetzt (Start 9:00 Uhr). Die Hypoxie-Behandlung erfolgte dabei in transparenten, luftdichten Acrylboxen (Volumen 7 l), wobei pro Box maximal drei Petrischalen ohne Deckel platziert wurden. Die Boxen wurden mit 2 l/min N₂ begast (AIR LIQUIDE, Düsseldorf, Deutschland). Um sicherzustellen, dass die Sauerstoffkonzentration 0 % betrug, wurde diese durch Gaschromatographie überprüft. Kontrollen wurden für die gleiche Dauer in Dunkelheit in den Boxen an der Luft inkubiert. Eine darauffolgende Wiederbelüftung wurde für 7 Tage unter normalen Langtagbedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Keimlinge den Kategorien „lebend“ (Bildung neuer Blätter), „beschädigt“ (teilweise Chlorose der Blätter) oder „tot“ (vollständige Chlorose der Blätter) zugeordnet.

2.10.3 Überflutungsexperimente mit adulten Pflanzen

Für Überflutungsexperimente, bei denen anschließend das Transkript durch RT-qPCR analysiert wurde, wurden Arabidopsis-Pflanzen bis zum 10-Blattstadium im KT angezogen. 2 h nach Beginn der Photoperiode wurden die Pflanzen in Dunkelheit überflutet. Kontrollen wurden für die gleiche Zeit unter normalen Kurztagbedingungen (Kontrolle Licht) sowie in Dunkelheit (Kontrolle Dunkelheit) inkubiert. Nach 24 h wurde das Blattmaterial geerntet (pro Bedingung wurde das Material von zwei Pflanzen vereint). Zur Analyse der Überflutungstoleranz wurden Pflanzen der entsprechenden Genotypen bis zum 10-Blattstadium angezogen und für die angegebene Zeitdauer in Dunkelheit überflutet. Kontrollen wurden in Dunkelheit an der Luft für die gleiche Zeit inkubiert. Nach zwei Wochen der Erholungsphase im KT wurde die Überlebensrate bestimmt. Diese wurde als die Fähigkeit, neue Blätter auszubilden, definiert.

2.10.4 ABA-Experimente

Zur Analyse der Keimungsetablierung in der Gegenwart von Abscisinsäure (ABA) wurden die Samen des gleichen Alters der getesteten Genotypen auf MS-Agarplatten mit 0, 0,3, 0,5 und 0,7 µM ABA (Duchefa, Haarlem, Niederlande, A0941.0100) ausgebracht (für alle ABA-Experimente wurde MS-Medium ohne Saccharose verwendet). Die Fähigkeit zur Keimungsetablierung wurde nach 10 Tagen im LT dokumentiert. Zur Quantifizierung wurde die Keimung in drei Kategorien eingeteilt: keine sichtbare Keimwurzel (tot), sichtbare Keimwurzel (> 1 mm) und vollständige Keimlingsentwicklung (inklusive der Ausbildung grüner Kotyledonen).

Für die Expressionsanalyse ABA-responsiver Gene wurden 7 Tage-alte Keimlinge mit 100 µM ABA (gelöst in Ethanol) besprüht und für 4 h inkubiert, während Kontrollpflanzen gleichermaßen mit Wasser (versetzt mit der gleichen Menge an Ethanol) besprüht wurden. Zur Analyse des Wurzelwachstums wurden Keimlinge für 3 Tage auf MS-Agarplatten angezogen und dann auf neue MS-Agarplatten mit 0, 0,5, 10, 30, 50 und 100 µM ABA übersetzt. Die Wurzellängen wurden nach weiteren 14 Tagen bestimmt (n > 10 pro Replik und Bedingung).

2.10.5 Verwundungs- und Trockenstress

Für Verwundungsexperimente wurden Pflanzen für ca. 3 Wochen bis zum 8-Blattstadium im KT auf Erde angezogen. Anschließend wurden alle Blätter sanft mit einer Nadel verwundet. Das Blattmaterial (zwei Pflanzen wurde pro Behandlung vereinigt) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (10, 20 und 30 min und 1, 3 und 6 h). Nicht verwundete Kontrollen wurden am Anfang (0 h) und am Ende der Behandlung (nach 6 h) geerntet.

Für die progressive Trockenstressbehandlung von 3 Wochen-alten Pflanzen in Erdtöpfen (KT) wurden diese für 9 Tage nicht gewässert (Trockenstress Erde), während Kontrollen weiterhin gut gewässert wurden (Kontrolle Erde). Für die Trockenstressbehandlung auf Papier wurden die Blattrosetten entweder mit oder ohne Wurzel für 3 h auf Papier exponiert (Trockenstress Papier). Als Kontrollbehandlung dienten hier auf Papier exponierte Pflanzen inklusive Wurzel, wobei die Wurzel mit feuchtem Papier bedeckt wurde, um eine Austrocknung zu verhindern (Kontrolle Papier).

2.10.6 H₂O₂, MeJA und ACC-Behandlung

7 Tage-alte WT Col-0 Keimlinge wurden auf MS-Agarplatten ohne Saccharose angezogen und mit 10 mM H₂O₂ (gelöst in H₂O), 50 µM MeJA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland 392707; gelöst in Ethanol) oder 500 µM ACC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, A3903; gelöst in H₂O) besprüht. Kontrollplatten wurde gleichermaßen mit Wasser bzw. Wasser plus Ethanol besprüht. Zu jeder Behandlung wurden 0,01 % (v/v) Tween-20 zugegeben, und das Pflanzenmaterial wurde nach 1 h geerntet.

2.11 Mikroarrayanalysen

Für Mikroarrayexperimente wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Für die Analyse des Effekts der *ERF#111*-Überexpression wurde die RNA von 7 Tage-alten Keimlingen von zwei unabhängigen OE-Linien, *ERF#111-OE1* und *ERF#111-OEII* extrahiert, welche zuvor in Wurzel und Spross getrennt wurden und mit der Expression in Wurzel und Spross von Col-0 verglichen. Für den Verwundungsarray wurde die RNA von ganzen Rosetten (außer den Kotyledonen) 3 Wochen alter Pflanzen von Col-0 und *erf#111-2* Mutanten 3 h nach Verwundung geerntet.

Für den Glukokortikoid-induzierbaren Protoplastenassay wurde die RNA von *p35S:AtERF#111-HBD* und *35S:GFP-HBD* transformierten Protoplasten (isoliert aus *erf#111-2*) extrahiert. Für den Mikroarray zur Charakterisierung von *AtLBD41* wurde die RNA von *p35S:HA-GFP*, *p35S:AtLBD41-HA* und *p35S:AtLBD41ΔEAR:VP16-HA* transformierten Protoplasten (isoliert aus Col-0) extrahiert.

Die RNAs wurden von der zentralen Genomanalytik und Bioinformatik Einrichtung (PD Dr. Alfons Weig, Universität Bayreuth) prozessiert. Für die Hybridisierung der Proben wurde der Arabidopsis 4x44k Array von Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) verwendet (Design ID 021169). Pro Probe wurden

150 ng RNA mit Hilfe des Low Input Quick Amp Labeling Kits (manual G4140-90050, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gemäß Herstellerangaben mit den Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Es wurden sogenannte *Dye-Swap* Experimente durchgeführt. Die Hybridisierung wurde gemäß dem Two-Color Microarray Based Gene Expression Analysis Protokoll (manual G4140-90050, Agilent Technologies) durchgeführt. Prozessierte Mikroarrays wurden mit einem hochauflösenden Mikroarray Scanner analysiert (Agilent Technologies) und Spot-Intensitäten mit der dazugehörigen Extraktions-Software quantifiziert. Daten wurden mit dem LIMMA-Paket in R ausgewertet. Bei jedem Array wurde der Hintergrund korrigiert und mit dem Loess-Algorithmus normalisiert. Zur Normalisierung zwischen den Arrays wurde die Quantile-Methode angewendet. Signifikant veränderte Gene mit einem Unterschied in der Expression größer als 2 ($|Signal-Log2-Ratio (SLR)| > 1$) und einem *P-value* kleiner als 0,01 wurden für weitere Analysen ausgewählt.

2.12 Gene-Ontology Analysen

Die durch Transkriptom-Analysen identifizierte differentiell exprimierte Gene (DEGs) wurden einer *Gene-Ontology* (GO) Analyse unterzogen, um eine Anreicherung der GO-Kategorien biologischer Prozess, molekulare Funktion oder zelluläres Kompartiment zu untersuchen. Dafür wurde in R die GOHyperGall Funktion verwendet (Horan et al. 2008). GO-Kategorien mit einem *P-value* < 0,05 wurden als signifikant angereichert eingestuft.

2.13 Mikrotomschnitte und Analyse des Wurzelhaarphänotyps

Für Mikrotomschnitte wurden 7 Tage-alte Wurzeln von Keimlingen verwendet. Für die chemische Fixierung wurden die Wurzeln für 30 min mit Fixierungslösung (2 % (w/v) Paraformaldehyd, 1 % (v/v) Glutaraldehyd, 1 % (w/v) Coffein, 0,01 % Triton X-100 in 0,1 M Phosphatpuffer (6,15 ml 1M K_2HPO_4 + 3,85 ml 1M KH_2PO_4 , ad 100 ml H_2O , pH 7,0)) infiltriert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die anschließende mechanische Fixierung wurden die Wurzeln zwei Mal mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4; 80,2 ml K_2HPO_4 + 19,8 ml 1M KH_2PO_4 , ad 1000 ml H_2O) gewaschen und dann in folgenden Bädern schrittweise für je 30 min dehydriert: 50, 70, 90, 95 und 100 % Ethanol, 1-Butanol/Ethanol 1:1 (v/v) gefolgt von 100 % 1-Butanol. Zur Einbettung wurde das Kunststoffeinsbettungssystem Technovit 7100 (Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) nach Herstellerangaben angewandt. Wurzelschnitte (15 μ m) wurden mit Hilfe des 2050 SuperCut Mikrotoms (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und unter einem DM1000 Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) betrachtet. Um die Länge ($n > 130$) und Anzahl ($n > 14$) an Wurzelhaaren an der Wurzelspitze sowie Wurzelbasis zu bestimmen, wurden Fotos der 7 Tage-alten Keimlingen mit der RS Photometrics CoolSnap Kamera, gekoppelt an ein M3B Stereomikroskop (WILD HEERBRUGG AG, Heerbrugg, Schweiz), aufgenommen. Wurzellängen wurden mit Hilfe des Programms ImageJ (Version 1.44p; <https://imagej.nih.gov/ij/>) vermessen.

2.14 Konfokale Mikroskopie

Zur subzellulären Lokalisation und Bildgebung von transient transformierten Tabakblättern, aber auch von stabil transformierten Arabidopsis-Pflanzen wurde die GFP-Fluoreszenz durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie mit Hilfe des LEICA TCS SP2 Mikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) analysiert (λ_{ex} 488 nm für GFP- und Chlorophyll-Anregung, λ_{em} 530–555 nm für GFP- und 650–720 nm für Chlorophyll-Emission). Wurzelmaterial von stabil transformierten Arabidopsis-Linien wurde zuvor mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid für 2-3 min gefärbt.

2.15 Qualitative Biolumineszenzmessung

Zur qualitativen Messung der Luciferase-Aktivität der Promotor:LUC Konstrukte, welche stabil in Arabidopsis transformiert wurden, wurden die intakten Pflanzen gleichmäßig mit 2 mM D-Luciferin (PJK, Kleinbittersdorf, Deutschland) + 0,1 % (v/v) Triton X-100 besprüht. Die Pflanzen wurden in einem Chemilumineszenz-Detektor (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einer Belichtungszeit von 20 min fotografiert.

2.16 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurden jeweils Ergebnisse aus mindestens drei biologisch unabhängigen Replikaten ausgewertet. Aus den Werten wurden dann jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Um signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Bedingungen feststellen zu können, wurde eine einfaktorische ANOVA (*Analysis of Variance*) in Verbindung mit dem post-hoc-Test Tukey's HSD (*honestly significant difference*) durchgeführt.

2.17 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma Macrogen (Amsterdam, Niederlande) in Auftrag gegeben, um klonierte Sequenzen auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen. Eine Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.2.6.0).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktors AtERF#111

3.1.1 Die Expression von *AtERF#111* wird durch Hypoxie und Überflutung induziert

Da *AtERF#111* aufgrund seines N-terminalen Motivs mit den Aminosäuren Methionin und Cystein ein potentiell Ziel für den Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* darstellt, lag das Interesse zunächst darin, herauszufinden, inwieweit die Expression von *AtERF#111* sauerstoffabhängig reguliert wird.

Frühere Expressionsstudien an Pflanzen in Zusammenhang mit Hypoxie oder Überflutung enthielten keine Information über *AtERF#111* (AT5G64750), da dieses Gen auf dem weit verbreiteten *Affymetrix* Mikroarray Chip nicht repräsentiert wird. Neuere Technologien der Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) sowie die Verwendung des *Agilent Arabidopsis 4x44k* Chips haben jedoch interessante Expressionsmuster von *AtERF#111* hervorgebracht: Mittels RNA- und Ribosomen-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass die Expression von *AtERF#111* signifikant durch Überflutung induziert wird (van Veen et al., 2016; Yeung et al., 2018). Van Veen et al. (2016) überfluteten *Arabidopsis*-Pflanzen verschiedener Ökotypen für vier Stunden in Dunkelheit. Die Expression von *AtERF#111* war in allen acht getesteten Ökotypen (Cvi-0, Bay-0, Ita-0, Col-0, Kas-1, Ws-2, Lp2-6, C24) ausschließlich im Spross erhöht und nicht in der Wurzel (Abb. 3).

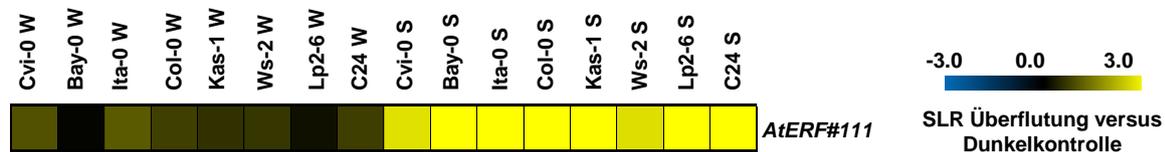


Abb. 3 | Die Expression von *AtERF#111* bei Überflutung in verschiedenen *Arabidopsis*-Ökotypen.

Untersucht wurde die Expression von *AtERF#111* in Wurzel (W) und Spross (S) nach 4 h Überflutung in Dunkelheit von 8 verschiedenen *Arabidopsis* Ökotypen (Cvi-0, Cape Verde Islands; Bay-0, Bayreuth; Ita-0, Ibel Tazekka; Col-0, Columbia; Kas-1, Kashmir; Ws-2, Wassilewskija; Lp2-6, Lipovec; C24). RNA-Seq-Daten stammen von van Veen et al. (2016). *Signal-Log2-Ratios* (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt.

Diese Ergebnisse konnten im Rahmen folgender Versuche bestätigt werden (Abb. 4). Drei Wochen alte *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen wurden für 24 h in Dunkelheit überflutet und die Expression von *AtERF#111* mittels quantitativer *Real-Time* PCR (RT-qPCR) im Spross analysiert (Abb. 4A). Als Kontrollen dienten Pflanzen, die für die gleiche Zeitdauer unter normalen Kurztagbedingungen inkubiert wurden (Kontrolle Licht) sowie Pflanzen, die für die gesamte Dauer in Dunkelheit inkubiert wurden (Kontrolle Dunkel). Interessanterweise wurde die Expression von *AtERF#111* schon allein durch Dunkelheit signifikant induziert, der zusammengesetzte Stress aus Dunkelheit und Überflutung hatte jedoch den größten Effekt (Abb. 4A).

Zudem wurde die Expression von *AtERF#111* in 7 Tagen-alten Keimlingen unter hypoxischen Bedingungen untersucht (Abb. 4B). Die Expression von *AtERF#111* war nach 8 h Hypoxie (H) im Licht signifikant erhöht, während nach 2 h Hypoxie noch kein Effekt und nach 4 h Hypoxie nur eine leichte Tendenz der Transkriptakkumulation zu verzeichnen war. Die Expression blieb nach 8 h Hypoxie und darauffolgender Wiederbelüftung (Reaeration, RA) für 1 h erhöht, nach 16 h RA konnte keine erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle mehr detektiert werden. Eine getrennte Analyse von Wurzel und Spross der Keimlinge nach 6 h Hypoxie konnte aufzeigen, dass *AtERF#111* nicht in der Wurzel induziert wurde, sondern auch hier die Induktion von *AtERF#111* sprossspezifisch war (Abb. 4C).

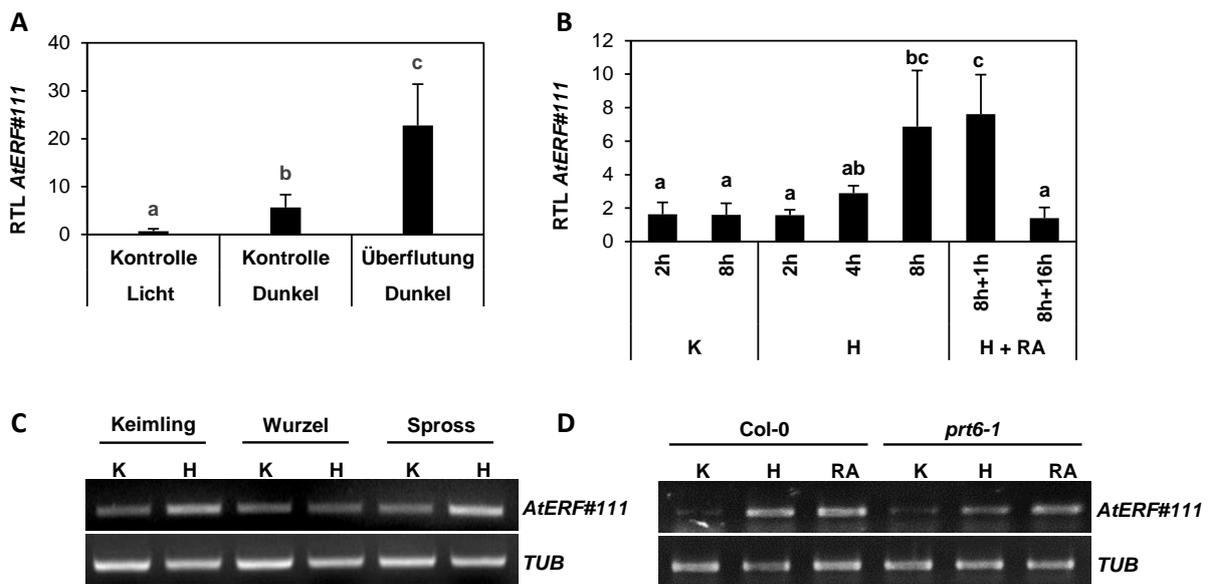


Abb. 4 | Analyse der Expression von *AtERF#111* bei Hypoxie und Überflutung.

(A) Col-0 Pflanzen im 10-Blattstadium (Kurztag) wurden 2 h nach Beginn der Photoperiode in Dunkelheit überflutet. Kontrollen wurden für die gleiche Zeit unter normalen Kurztagbedingungen (Kontrolle Licht) sowie in Dunkelheit (Kontrolle Dunkelheit) inkubiert. Nach 24 h wurde das Blattmaterial geerntet (pro Bedingung wurde das Material von zwei Pflanzen vereint). (B) 7 Tage alte WT Keimlinge wurden für 2, 4 und 8 h mit Hypoxie (H) behandelt sowie 8 h H gefolgt von 1 h oder 16 h Wiederbelüftung (RA). Kontrollen (K) wurden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. (A + B) Relative Transkriptlevel (RTL) wurden mittels RT-qPCR analysiert und auf das Referenzgen *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* normalisiert. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test). (C) Repräsentatives Ergebnis von drei semiquantitativen RT-PCR Analysen. *AtERF#111* Expression in 7 Tagen alten Keimlingen (ganzer Keimling oder Wurzel und Spross getrennt) nach 6 h Hypoxie (H) im Vergleich zu Kontrolle (K). *TUBULIN (TUB)* diene als Referenzgen. (D) Expression von *ATERF#111* in 7 Tagen alten Keimlingen von Col-0 und *prt6-1* nach 6 h Hypoxie (H) gefolgt von 1h Wiederbelüftung (RA). Kontrollen (K) wurden unter normoxischen Bedingungen inkubiert.

Darüber hinaus wurde die Expression von *AtERF#111* in Keimlingen der *Arg/N-degdon pathway* Mutante *prt6-1* analysiert (Abb. 4D). Letztere zeichnet sich durch eine konstitutive Hypoxie-Antwort aus, da das für den Abbau essentielles Enzym, die Ubiquitin Ligase PRT6

durch eine T-DNA Insertion nicht mehr funktionell vorliegt. Es konnten keine Expressionsunterschiede von *AtERF#111* im Vergleich beider Genotypen festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass *AtERF#111* kein Zielgen der GVIIFs darstellt. Dementsprechend konnte auch kein HRPE-Element 3 kb stromaufwärts des Start-Codons von *AtERF#111* mit Hilfe des RSA-Tools *matrix-scan* identifiziert werden, welches in Promotoren von Hypoxie-responsiven Genen angereichert ist und für die Aktivierung dieser durch Bindung von RAP2.2 und RAP2.12 eine wichtige Rolle spielt (Gasch et al., 2016).

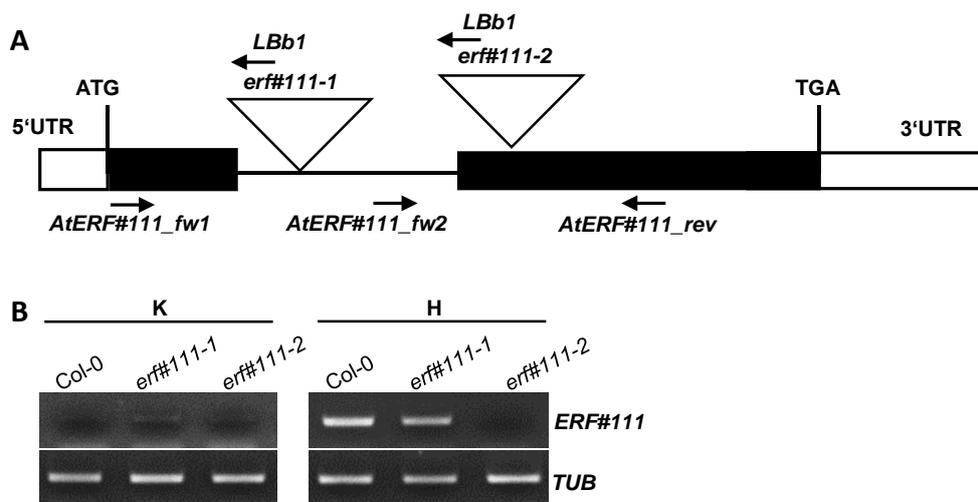


Abb. 5 | Analyse von *AtERF#111* T-DNA Insertionslinien.

(A) Genstruktur und T-DNA Insertionsstellen (nicht maßstabsgetreu). Die T-DNA Insertion von *erf#111-1* befindet sich im Intron und von *erf#111-2* im zweiten Exon. Pfeile zeigen die Richtung der T-DNA Insertion vom rechten zum linken T-DNA Rand. LBb1: Primer, spezifisch für den linken Rand der T-DNA; Primerkombinationen, die zum Genotypisieren benutzt wurden: *AtERF#111_fw1* + *AtERF#111_rev* (WT); *AtERF#111_fw1* + LBb1 (*erf#111-1*); *AtERF#111_fw2* + LBb1 (*erf#111-2*). **(B)** Analyse des *AtERF#111* Transkripts unter Kontrollbedingungen (K) und nach 4 h Hypoxie (H) im Vergleich zur Referenz *TUBULIN* (*TUB*) durch semiquantitativen RT-PCR Analyse.

Um herauszufinden, ob eine veränderte Expression von *AtERF#111* einen Einfluss auf die Überlebensrate nach Überflutung hat, wurden zwei T-DNA Insertionslinien isoliert, SALK_094151C (*erf#111-1*) und SALK_012151C (*erf#111-2*) (Abb. 5A). Wie bereits annotiert (<http://www.arabidopsis.org>), konnte für *erf-111-1* die T-DNA Insertion im Intron und für *erf#111-2* im zweiten Exon durch Sequenzierung bestätigt werden. Nur für *erf#111-2* konnte kein Transkript nach Hypoxie-Behandlung nachgewiesen und somit von einem vollständigen Funktionsverlust des Gens ausgegangen werden, während anzunehmen ist, dass die T-DNA von *erf#111-1* im Intron durch Spleiß-Vorgänge entfernt wurde (Abb. 5B). Folglich wurden alle weiteren Versuche ausschließlich mit *erf#111-2* durchgeführt.

Um nun die Überflutungstoleranz zu analysieren, wurden Pflanzen von Col-0 und *erf#111-2* im 10-Blattstadium (ca. 3 Wochen alt) verwendet und für 4, 5, 6 und 7 Tage in Dunkelheit überflutet, während Kontrollpflanzen für die gleiche Dauer in Dunkelheit an der Luft inkubiert wurden (Abb. 6).

Nach 2 Wochen Erholungszeit im normalen Kurztag-Rhythmus wurde die Überlebensrate, welche als Fähigkeit zur Bildung neuer Blätter definiert wurde, bestimmt. Pflanzen der *erf#111-2* Mutante zeigten keine veränderte Überlebensrate im Vergleich zu Col-0. Nach 6 Tagen überlebten ca. zwei Drittel der Pflanzen, nach 7 Tagen waren alle tot (Abb. 6). Zudem wurden stabile *AtERF#111*-Überexpressionslinien (OE-Linien) im Arabidopsis Col-0 Hintergrund generiert (vgl. Abschnitt 3.1.6). Die Analyse der Überflutungstoleranz zeigte für *AtERF#111*-OEII eine leicht verminderte Überlebensrate im Vergleich zu Col-0 und *erf#111-2* (Abb. 6), was aber womöglich darauf beruht, dass die OE-Linien schon unter normoxischen Bedingungen phänotypische Unterschiede zu Col-0 aufwiesen (vgl. Abschnitt 3.1.6).

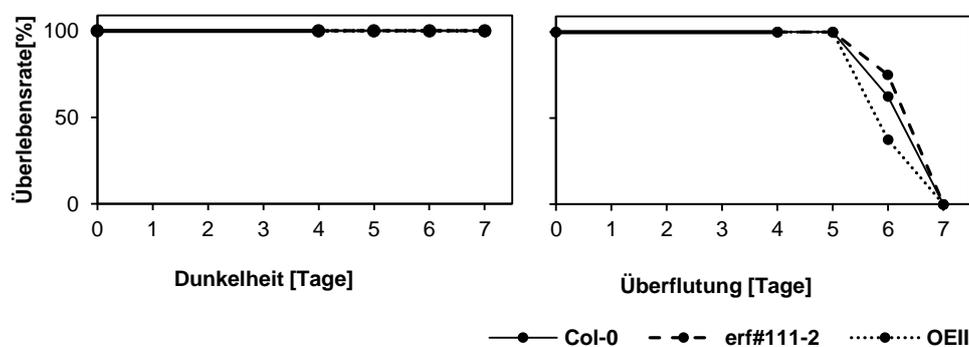


Abb. 6 | Analyse des Einflusses von *AtERF#111* auf die Überflutungstoleranz.

Pflanzen des WT Col-0, *erf#111-2* und *ERF#111*-OE II (OEII) wurden im 10-Blattstadium für 4, 5, 6 und 7 Tage in Dunkelheit überflutet. Kontrollen wurden in Dunkelheit + Luft für die gleiche Zeit inkubiert. Nach 2 Wochen der Erholungsphase unter Kurztagbedingungen wurde die Überlebensrate bestimmt. Diese wurde als die Fähigkeit neue Blätter auszubilden definiert. Gezeigt sind Daten von einem Replikate ($n > 8$). Daten weiterer Replikate befinden sich im Anhang (Abb. A 1).

3.1.2 *AtERF#111* ist kein Substrat des *Arg/N-degron pathways*, unterliegt jedoch trotzdem einer Ubiquitin-abhängigen Degradation

Der N-Terminus von *AtERF#111* beginnt mit den Aminosäuren Methionin und Cystein (MC), weshalb dieser Transkriptionsfaktor ein potentielles Substrat für den Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* darstellt. Interessanterweise scheint die N-terminale Region von *AtERF#111* (inklusive der ersten 8 Aminosäuren) hoch konserviert in homologen Proteinen verschiedener Brassicaceae, unter anderem *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis halleri* oder *Capsella rubella* zu sein (Abb. 7A,B).

Es wurde bereits gezeigt, dass eine Substitution von Cystein zu Alanin in dem N-terminalen MC-Motiv der GVIERFs ausreichend ist, um einen Abbau durch den Cys/Arg Zweig des PRT6 *N-degron pathways* zu verhindern und eine Stabilisierung der GVIERFs unter normoxischen Bedingungen herbeizuführen (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011; Gibbs et al., 2014).

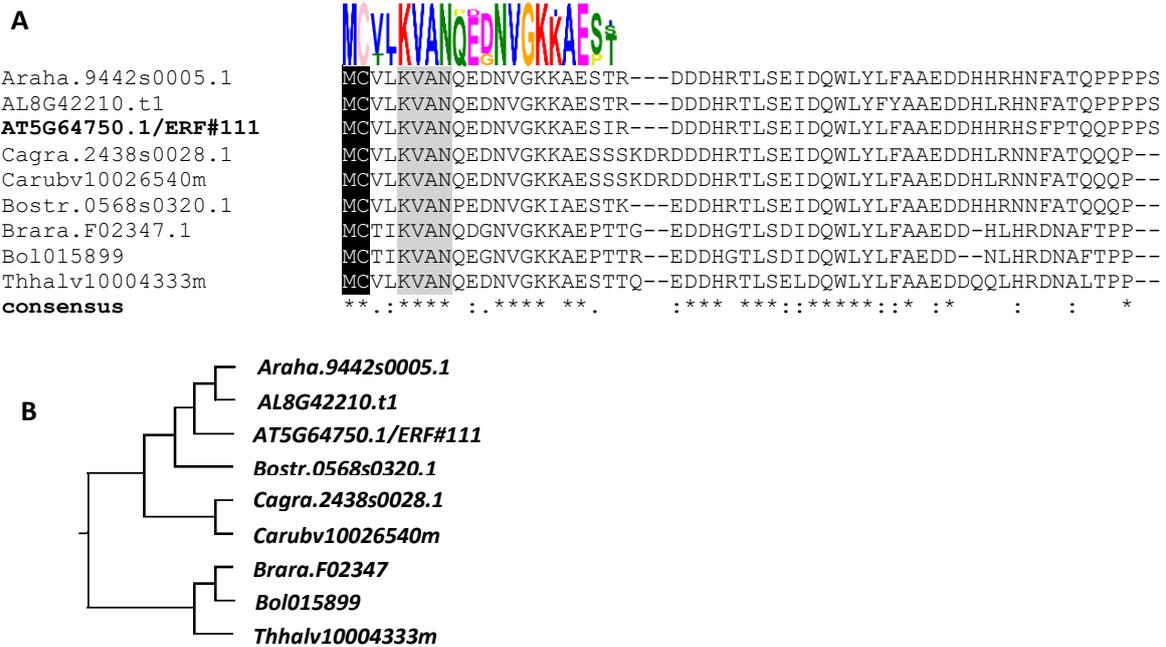


Abb. 7 | Das N-terminale Aminosäuremotiv von AtERF#111 ist hoch konserviert.

(A) N-terminales Alignment von AtERF#111 und homologen Proteinen ausgewählter Brassicaceae, die alle mit den Aminosäuren Met-Cys (MC) beginnen. *Arabidopsis halleri* (Araha.9442s0005.1), *Arabidopsis lyrata* (AL8G42210.t1), *Capsella grandiflora* (Cagra.2438s0028.1), *Capsella rubella* (Carubv10026540m), *Boechera stricta* (Bostr.0568s0320.1), *Brassica rapa* (Brara.F02347.1), *Brassica oleracea* (Bol015899), *Thellungiella halophila* (Thhalv10004333m). Graphische Darstellung der Wahrscheinlichkeit der ersten 20 Aminosäuren (MPI bioinformatics toolkit, (Zimmermann et al., 2018) (B) Phylogenetischer Stammbaum, erstellt anhand der Proteinsequenzen aus (A).

Folglich wurden Konstrukte generiert, die AtERF#111 zum einen mit dem natürlichen Met-Cys und zum anderen mit dem mutierten Met-Ala im N-terminalen Motiv enthielten (Abb. 8). In Übereinstimmung mit der Funktion eines Transkriptionsfaktors konnten beide Konstrukte in Fusion mit einem C-terminalen GFP-Tag im Zellkern lokalisiert werden. Dies wurde sowohl in Wurzeln von stabilen *ERF#111*-Überexpressionslinien im *Arabidopsis* Hintergrund *prt6-1* (Abb. 8A) als auch in transient transformierten Tabakblättern (Abb. 8B) bestätigt.

Da bei den transformierten Tabakblättern kein klarer Unterschied in der Fluoreszenzintensität und damit in der Stabilität der beiden AtERF#111 Versionen ausgemacht werden konnte, wurde die Proteininstabilität mittels dem sogenannten Cykloheximid (CHX)-Chase Verfahren in *Arabidopsis* WT Protoplasten *in vivo* analysiert (Abb. 8C). Die Experimente wurden von Maria Klecker am Leibnizinstitut für Pflanzenbiochemie in Halle durchgeführt.

Hierbei wurden die beiden AtERF#111 Versionen (MC)AtERF#111 und (MA)AtERF#111 (diesmal mit C-terminalen HA fusioniert) transient in Protoplasten überexprimiert und anschließend die Synthese neuer Proteine durch den Translationsinhibitor CHX inhibiert. Die Detektion von AtERF#111 mittels Western-Blot zeigte schließlich, dass beide Konstrukte unabhängig von ihrem N-Terminus innerhalb von 3 h abgebaut wurden (Abb. 8C). Daraus konnte geschlossen werden, dass AtERF#111 keinem

Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* unterliegt. Obwohl das Molekulargewicht für AtERF#111^{3HA} bei 49 kDa liegt, wurde das Protein bei ca. 60 kDa detektiert, was einen Hinweis auf potentielle posttranslationale Modifikationen darstellt. Eine Ko-Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 führte jedoch zu einer klaren Akkumulation von beiden AtERF#111 Konstrukten (Abb. 8D). Dieses Ergebnis zeigt, dass AtERF#111 durch das 26S-Proteasom abgebaut wird, obwohl es trotz seines N-terminalen MC-Motivs kein Substrat des *Arg/N-degron pathways* darstellt.

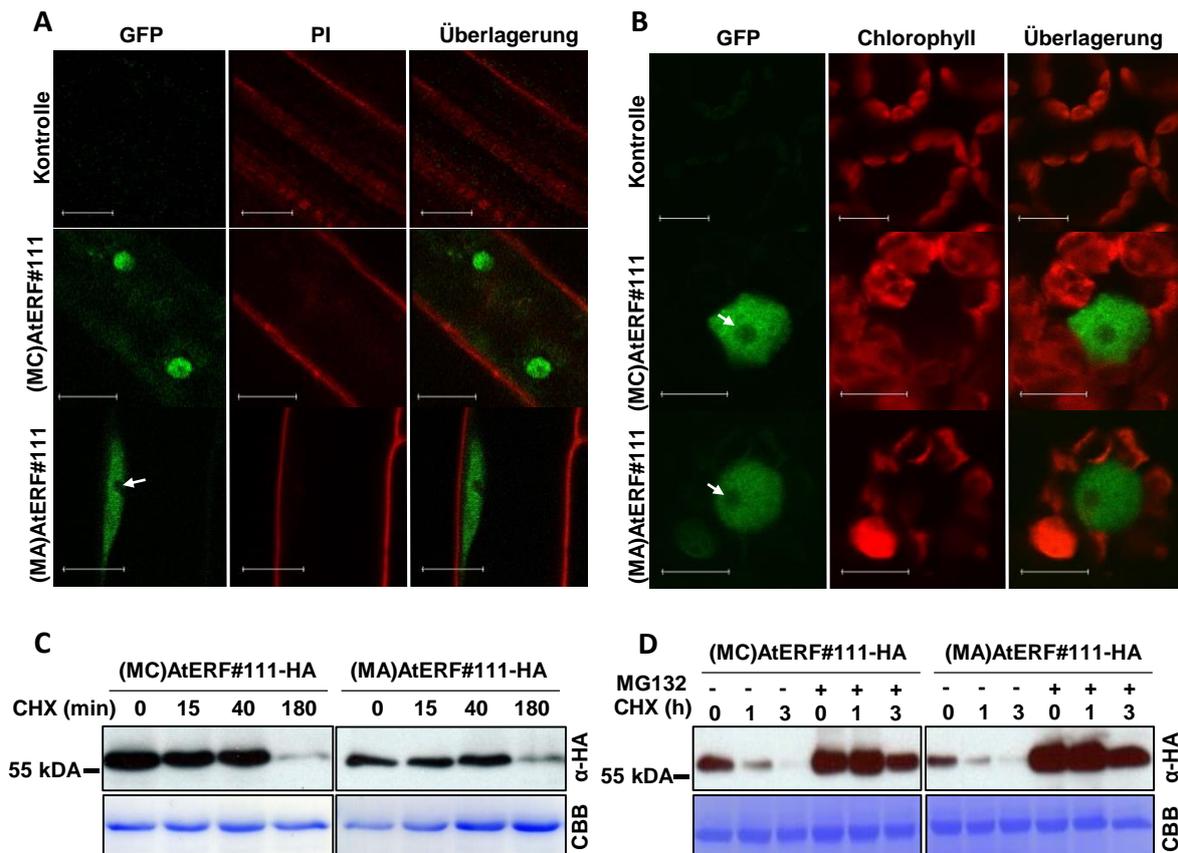


Abb. 8 | AtERF#111 ist kein Substrat des *Arg/N-degron pathways*, wird jedoch trotzdem durch das 26S-Proteasom abgebaut.

(A) Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie-Visualisierung von Wurzeln der Arabidopsis-Mutante *prt6-1*, die stabil die Konstrukte p35S:(MC)AtERF#111-GFP und p35S:(MA)AtERF#111-GFP exprimieren. PI = Propidium Iodid; Maßstab: 10 µm; Die Bilder zeigen PI-Färbung und GFP-Fluoreszenz sowie die Überlagerung beider. Weiße Pfeile zeigen den Nukleolus. **(B)** Die gleichen Konstrukte wurden zudem transient in Tabakblätter exprimiert. Maßstab: 15 µm. **(C)** Stabilität von AtERF#111 Konstrukten mit einem modifizierten N-Terminus in Arabidopsis WT-Protoplasten. Protoplasten wurden entweder mit p35S:(MC)AtERF#111-HA oder mit p35S:(MA)AtERF#111-HA transformiert und mit 100 µM Cycloheximid (CHX) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung wurde zur Ladekontrolle durchgeführt (Daten von Maria Klecker). Das Molekulargewicht für AtERF#111^{3HA} liegt bei 49 kDa. **(D)** CHX-Chase von p35S:(MC)AtERF#111-HA und p35S:(MA)AtERF#111-HA mit oder ohne Proteasominhibitor MG132 (50 µM) (Daten von Maria Klecker).

3.1.3 AtERF#111 ist kein Repressor der ABA-Antwort

3.1.3.1 Reproduktion der Versuche von Pandey et al. (2005)

Pandey et al. (2005) schlugen für AtERF#111 eine Funktion als Repressor der ABA-Antwort vor und nannten diesen Transkriptionsfaktor daher ABSCISIC ACID REPRESSOR 1 (ABR1). Diese Hypothese basierte auf Experimenten mit zwei T-DNA Insertionslinien im Col-0 Hintergrund (SAIL140_G06 und SALK_012151C). Neben einer Induktion der Expression von *AtERF#111* bei Kälte-, Salz- und Trockenstress konnte eine erhöhte *AtERF#111*-Transkriptmenge nach ABA-Behandlung beobachtet werden. Die Expression ausgewählter ABA-Markergene war in den *erf#111* T-DNA Insertionslinien im Vergleich zu Col-0 zudem deutlich erhöht. Darüber hinaus zeigte *erf#111* eine hypersensitive ABA-Antwort in Bezug auf die Keimung bei 0,7 µM ABA und das Wurzelwachstum bei 10 µM ABA (Pandey et al., 2005). Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Versuche wiederholt und eine der beiden von Pandey et al. (2005) verwendeten T-DNA Insertionslinien, *erf#111-2* (SALK_012151C), getestet. Zusätzlich wurden zwei His₆-FLAG-*ERF#111*-OE Linien (OEI und OEII) in die Versuche miteinbezogen, welche aus zwei unabhängigen T-DNA Insertionsereignissen hervorgingen (s. Abschnitt 3.1.6).

Der Keimungsversuch wurde mit verschiedenen ABA-Konzentrationen (0 - 0,7 µM ABA) durchgeführt und es wurden ausschließlich Samen des gleichen Alters verwendet (Abb. 9A). Letzteres ist äußerst wichtig, da die Sensitivität gegenüber ABA mit dem Alter der Samen variieren kann (Holman et al., 2009). Wie erwartet nahm die Fähigkeit zur Keimung mit steigender ABA-Konzentration ab, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen WT und *erf#111-2* ausgemacht werden (Abb. 9A). Die OE-Linien wiesen bereits unter Kontrollbedingungen phänotypische Auffälligkeiten, wie eine teilweise Gelbfärbung der Kotyledonen oder unterschiedliche Wurzellängen auf. Eine Überexpression von *AtERF#111* führte zu keiner ABA-Insensitivität im Vergleich zu Col-0, was man erwartet hätte, falls AtERF#111 einen Repressor der ABA-Antwort darstellt.

Der Wurzelwachstumsversuch lieferte ähnliche Ergebnisse. Zunächst konnte festgestellt werden, dass das Wurzelwachstum bei allen Linien mit steigender ABA-Konzentration abnahm (Abb. 9B). Dabei konnten auch hier keine Unterschiede zwischen Col-0 und *erf#111-2* verzeichnet werden. Die OE-Linien zeigten bei 50 und 100 µM ABA sogar noch kürzere Wurzellängen als der WT.

Die Analyse der Expression der ABA-responsiven Gene *ARABIDOPSIS THALIANA DROUGHT-INDUCED 8/RESPONSIVE TO ABA 18 (ATDI8/AtRAB18; AT5G66400)* und *RESPONSIVE TO DESICCATION 22 (AtRD22; AT5G25610)* bestätigte zunächst eine klare Induktion dieser durch die angewendete ABA-Behandlung, zeigte jedoch ebenfalls keine veränderte Expression zwischen *erf#111-2*, Col-0, OEI und OEII. Zudem konnte keine Induktion von *AtERF#111* durch ABA-Stress detektiert werden (Abb. 9C). Bestätigt wird dies zudem durch Transkriptomdaten von einem RNA-Seq Zeitreihen-Experiment (Song

et al., 2016) sowie durch eine Mikroarrayanalyse (Liu et al., 2013), welche auch keine differentielle Expression von *AtERF#111* nach ABA-Behandlung zeigten.

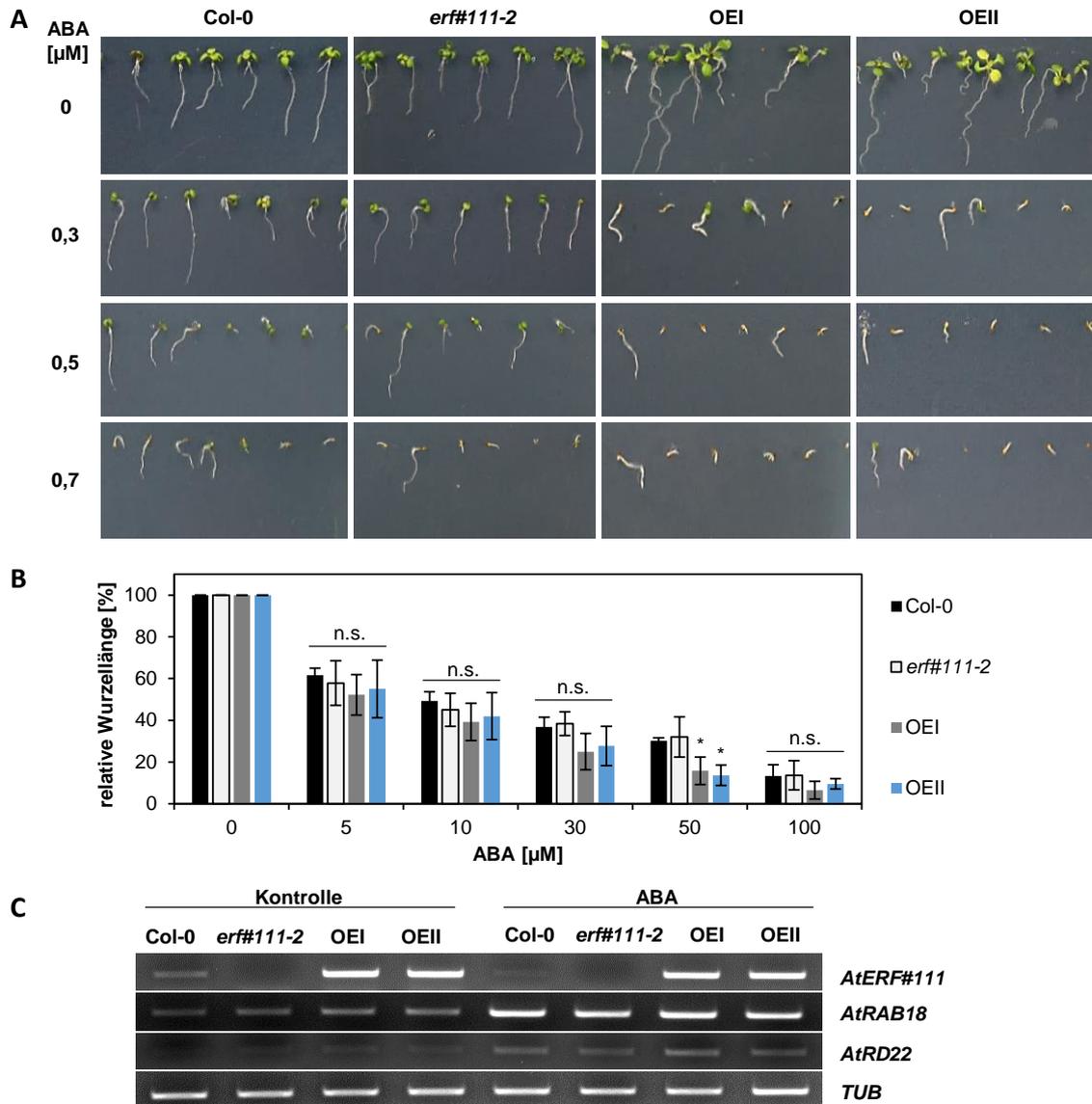


Abb. 9 | *AtERF#111* ist nicht in die ABA-Signalgebung involviert.

(A) Keimungsversuch in Anwesenheit von ABA. Samen gleichen Alters von Col-0, *erf#111-2*, *ERF#111*-OEI und *ERF#111*-OEII wurden auf MS-Platten mit verschiedenen ABA-Konzentrationen (0 - 0,7 μM) ausgebracht. Die Fähigkeit zur Keimung wurde nach 10 Tagen (Langtag) dokumentiert. Repräsentative Aufnahmen aus drei biologischen Replikaten. **(B)** Wurzelwachstumsversuch in Anwesenheit von ABA. 3 Tage alte Keimlinge von Col-0, *erf#111-2*, OEI und OEII wurden auf MS-Platten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen (0 - 100 μM ABA) ausgebracht. Nach weiteren 14 Tagen wurden die Wurzellängen gemessen. Gezeigt sind relative Wurzellängen im Vergleich zu Kontrollen in Prozent. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von mindestens 3 biologischen Replikaten ($n > 10$ pro Replikat und Behandlung). * zeigt einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test) im Vergleich zu Col-0 bei jeder ABA-Konzentration. N.s., nicht signifikant. **(C)** Expressionsanalyse der ABA-responsiven Gene *AtRAB18* und *AtRD22* nach ABA-Behandlung. Semiquantitative RT-PCR Analyse von 7 Tage alten Keimlingen, die mit 100 μM ABA für 4 h besprüht wurden. Kontrollpflanzen wurden analog mit Wasser besprüht. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse von drei biologischen Replikaten. *TUBULIN* (*TUB*) diente als Referenzgen.

3.1.3.2 Bestätigung der Wirksamkeit der ABA-Behandlung

Um die Effektivität der hier angewendeten ABA-Behandlung zu überprüfen, wurden sowohl Keimungs- als auch Wurzelwachstumsassay zusätzlich mit der bereits publizierten ABA-hypersensitiven Mutante *prt6-1* (Holman et al., 2009) sowie mit der ABA-insensitiven Quadrupel-Mutante des ABA Rezeptors *PYRABACTIN RESISTANCE1/PYR1-LIKE (PYR1/PYL) pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* (Park et al., 2009) durchgeführt (Abb. 10, Abb. 11). Die Fähigkeit zur Keimung wurde anhand folgender Kriterien in verschiedene Kategorien eingeteilt: keine erkennbare Keimwurzel (tot), erkennbare Keimwurzel (> 1mm) sowie vollständige Entwicklung des Keimlings (inklusive der Ausbildung grüner Kotyledonen). Tatsächlich zeigte *prt6-1* eine hypersensitive Inhibition der Keimung im Vergleich zu Col-0 und war bei keiner der getesteten ABA-Konzentrationen in der Lage, grüne Kotyledonen auszubilden (Abb. 10A, B).

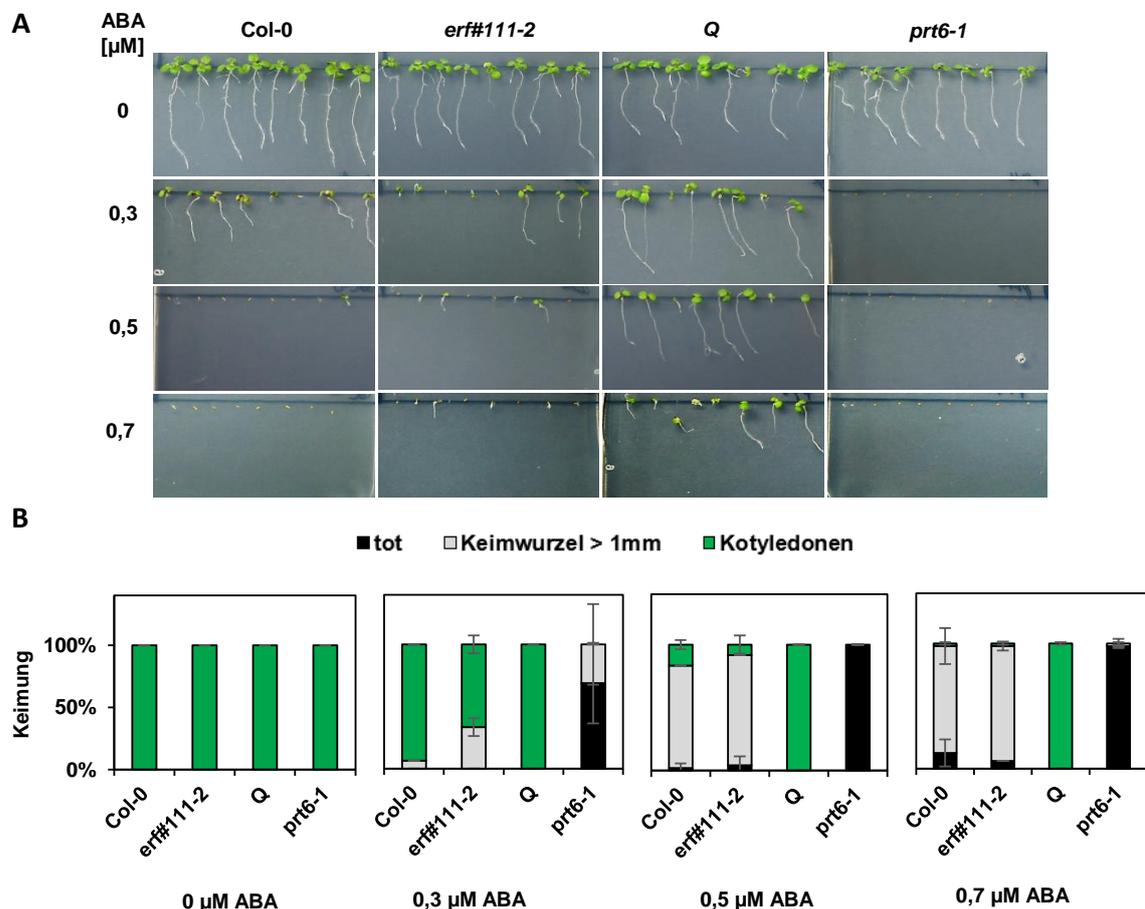


Abb. 10 | Analyse der ABA-Sensitivität der Keimung.

(A) Samen gleichen Alters von Col-0, *erf#111-2*, der Quadrupel-Mutante *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* (= Q) und *prt6-1* wurden auf MS-Agarplatten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen (0 - 0,7 μ M) ausgebracht und die Keimung nach 10 Tagen (Langtag) dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von drei biologischen Replikaten. (B) Die Keimung wurde quantifiziert und in drei Kategorien eingeteilt: keine sichtbare Keimwurzel (tot, schwarz), sichtbare Keimwurzel (> 1 mm, grau) und vollständige Keimlingsentwicklung (inklusive der Ausbildung grüner Kotyledonen, grün). Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei biologischen Replikaten ($n > 8$ pro Replikat und Behandlung).

Die Mutante *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* war hingegen ABA-insensitiv und zeigte sogar bei 0,7 μM ABA eine vollständige Entwicklung der Keimlinge. Im Gegensatz zu diesen Linien verhielt sich *erf#111-2* erneut analog zu Col-0 und zeigte bei 0,7 μM ABA einen intermediären Phänotyp mit 6 % bis 12 % toter Keimlinge und 80 % - 90 % mit erkennbarer Keimwurzeln (Abb. 10A, B).

Bezüglich des Wurzelwachstumsversuchs wiesen Keimlinge der Mutante *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* längere relative Wurzellängen sowie ein signifikant höheres relatives Gewicht auf als Col-0, während keine Unterschiede zwischen Col-0, *erf#111-2* und *prt6-1* zu verzeichnen waren (Abb. 11A, B). Dies war zu erwarten, da Holman et al (2009) für *prt6*-Allele zwar eine hypersensitive Keimung gezeigt hatten, jedoch keine Hypersensitivität bezüglich der ABA-Inhibierung der Wurzelelongation. Demnach bestätigen auch diese Daten, dass *erf#111-2* keine modifizierte ABA-Sensitivität im Vergleich zu Col-0 aufweist.

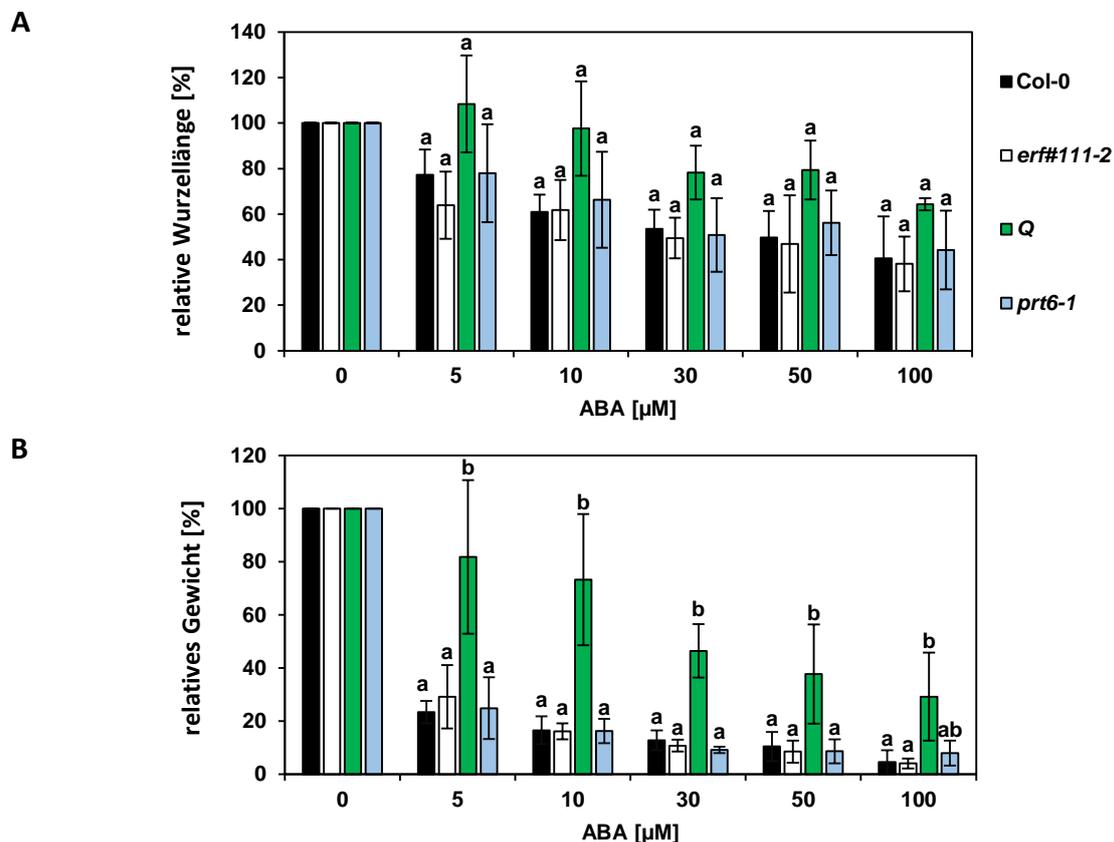


Abb. 11 | Einfluss von ABA auf das Wurzelwachstum und das Gewicht von Keimlingen.

(A) Wurzelwachstumsversuch in Anwesenheit von ABA. 3 Tage alte Keimlinge von Col-0, *erf#111-2*, *prt6-1* und *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* (= Q) wurden auf MS-Agarplatten mit unterschiedlichen ABA-Konzentrationen (0 - 100 μM ABA) ausgebracht. Nach weiteren 14 Tagen (Langtag) wurden die Wurzellängen gemessen. Gezeigt sind relative Wurzellängen im Vergleich zu Kontrollen in Prozent. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten ($n > 9$ pro Replikat und Behandlung). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant von Col-0 bei der jeweiligen ABA-Konzentration unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test). **(B)** Das Gewicht von jedem Keimling aus (A) wurde gemessen und ist als relatives Gewicht im Vergleich zu Kontrollen in Prozent dargestellt.

Zusammenfassend zeigen die hier durchgeführten Versuche, dass zumindest unter den getesteten Bedingungen *AtERF#111* nicht in die ABA-Signalgebung involviert zu sein scheint und damit keinen Repressor der ABA-Antwort darstellt, obwohl eine adäquate Wirksamkeit der angewandten ABA-Behandlung bestätigt wurde.

3.1.4 *AtERF111* wird nicht durch Trockenstress, sondern durch Verwundung induziert

Mikroarraydaten von Ha et al. (2014) implizierten eine Induktion der Expression von *AtERF#111* bei Trockenstress (*Gene Expression Omnibus* (GEO) *accession*: GSE48949). Hierbei wurden die Blattrosetten von 24 Tage-alten Pflanzen abgetrennt und für 0 (Kontrolle), 2 und 4 h auf Papier zum Trocknen platziert. Andere Mikroarraydaten zeigten jedoch keinen Effekt von Trockenstress auf die Expression von *AtERF#111*. So zum Beispiel der Datensatz von Nishiyama et al. (2013), welche 3 Wochen-alte Pflanzen in Erde für 10 Tage nicht gewässert und die Expression zu gut gewässerten Kontrollpflanzen verglichen hatten (GEO *accession*: GSE42290). Aufgrund der widersprüchlichen Befunde wurden beide Versuche wiederholt, um herauszufinden, ob *AtERF#111* nun tatsächlich differentiell bei Trockenstress reguliert wird (Abb. 12).

Zunächst wurden Pflanzen im 8-Blattstadium in Erde für 9 Tage nicht gewässert und anschließend das Blattmaterial geerntet. Im Vergleich zu Kontrollpflanzen konnte eine mehr als 250-fache Induktion des Trockenstress Markergens *AtRAB18* detektiert werden (Abb. 12A, B). Für *AtERF#111* konnte hingegen keine Änderung in der Transkriptmenge festgestellt werden, was die Daten von Nishiyama et al. (2013) bestätigt.

Wurden die Pflanzen lediglich für 3 h auf Papier inkubiert, stieg die Expression des Trockenstress Markers *AtRAB18* um das 30-fache im Vergleich zur Kontrolle (Zeitpunkt $t = 0$) (Abb. 12A, B). Auch *AtERF#111* selbst zeigte eine ca. 75-fache Induktion der Expression. Während Ha et al. (2014) nur die Blattrosetten ohne die Wurzel auf Papier exponierten, wurde hier die ganze Pflanze inklusive Wurzel verwendet. Wesentlich ist, dass dieser experimentelle Aufbau nicht die Expression von *AtERF#111* beeinflusste, da sowohl mit als auch ohne Wurzel eine vergleichbare Induktion von *AtERF#111* in den Blättern nach 3 h Trockenstress auf Papier beobachtet werden konnte (Abb. 12C). Folglich konnten auch die Daten von Ha et al. (2014) bestätigt werden.

Um dennoch aufzuklären, was nun den Unterschied dieser beiden Trockenstress-Behandlungen hervorruft, wurde für die Reproduktion der Ergebnisse von Ha et al. (2014) eine weitere Kontrolle eingeführt, in welcher die Wurzeln der auf Papier exponierten Pflanzen mit feuchtem Papier bedeckt wurden, um eine Austrocknung dieser zu verhindern (= Kontrolle Papier) (Abb. 12A, B). Interessanterweise erhöhte sich unter diesen Kontrollbedingungen die Expression von *AtERF#111* im gleichen Maße wie nach 3 h Trockenstress auf Papier. *AtRAB18* zeigte wie erwartet keine Induktion bei den Kontrollen auf Papier.

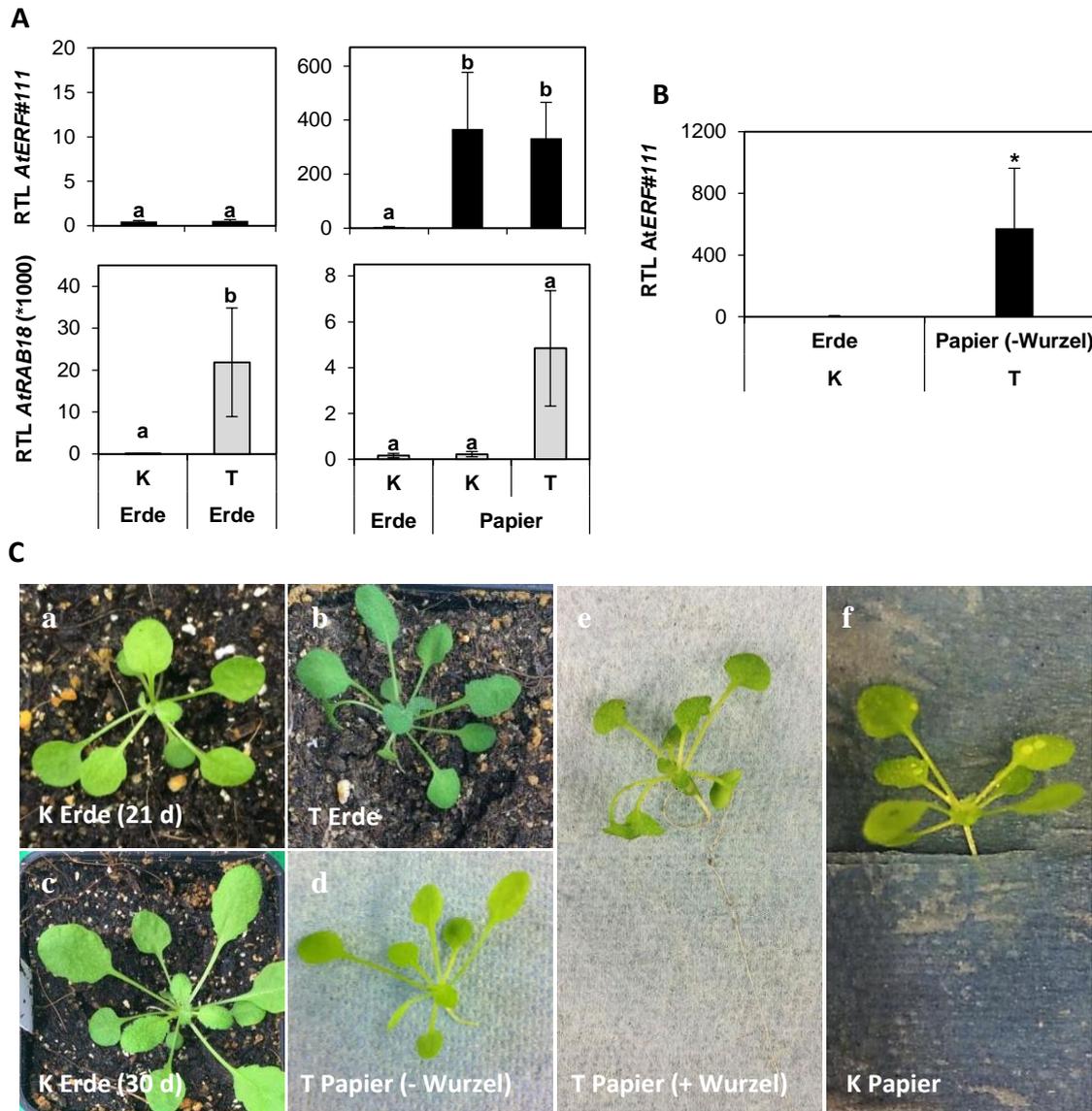


Abb. 12 | Die Expression von *AtERF#111* wird nicht durch Trockenstress, sondern sehr stark durch mechanischen Stress induziert.

(A) RT-qPCR Analysen von *AtERF#111* (schwarze Balken) und *AtRAB18* (graue Balken) relativer Transkriptlevel (RTL). Pflanzen im 8-Blattstadium (Kurztag) in Erde wurden für 9 Tage nicht gewässert (Trockenstress Erde = T Erde) oder für 3 h auf Papier exponiert (= T Papier). Entsprechende Kontrollen wurden entweder in Erde gut gewässert (= K Erde) oder bei Exposition auf Papier mit einem feuchten Tuch bedeckt (= K Papier). **(B)** Die Blattrosetten der Pflanzen (8-Blattstadium) wurden ohne Wurzel für 3 h dem Trockenstress auf Papier ausgesetzt. Vergleich zu Kontrollen in Erde (= K Erde). **(A+B)** Relative Transkriptlevel wurden auf das Referenzgen *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* normalisiert. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (T-Test für den Vergleich von zwei Mittelwerten; einfaktorielles ANOVA und Tukey HSD Test für den Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten). **(C)** Repräsentative Aufnahmen; **(a)** 3 Wochen alte Pflanzen im 8-Blattstadium (Kurztag); **(b)** nach 9 Tagen Trockenstress in Erde; **(c)** korrespondierende Kontrollpflanzen; **(d)** Trockenstress auf Papier ohne Wurzel; **(e)** Trockenstress auf Papier mit Wurzel; **(f)** Kontrollen mit bedeckten Wurzeln auf Papier.

Folglich lag der Schluss nahe, dass allein das Platzieren der Pflanze auf Papier schon ausreichend war, um die Expression von *AtERF#111* zu induzieren - womöglich verursacht durch Verwundung bzw. mechanischen Stress. Diese Annahme wurde durch ein unabhängiges Verwundungsexperiment bestätigt, in welchem die Blätter der Pflanzen mit einer Nadel verwundet wurden und nach verschiedenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet wurde (Abb. 13). Die Expression von *AtERF#111* wurde hierbei sehr stark induziert und erreichte nach 1 h ein Maximum (>300-fache Induktion), während nach 6 h die Expression wieder annähernd auf das ursprüngliche Niveau zurückgegangen war.

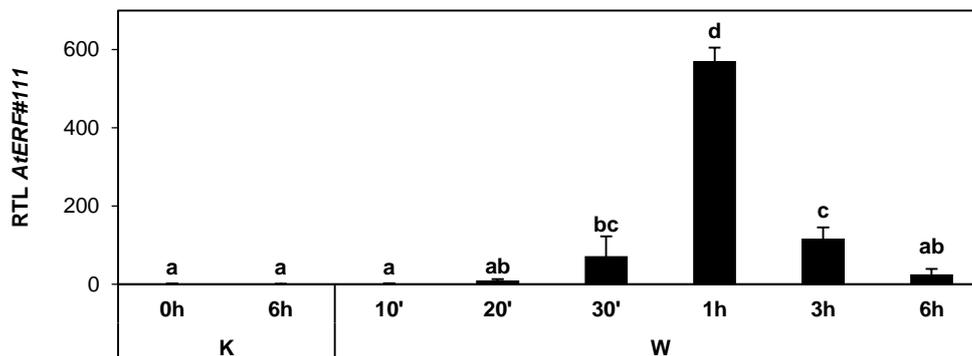


Abb. 13 | Die Expression von *AtERF#111* wird durch Verwundung induziert.

Die Blätter von 3 Wochen-alten Pflanzen wurden mit einer Nadel verwundet. Das Blattmaterial wurde zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (10, 20, 30 min und 1, 3, 6 h). Kontrollen wurden am Anfang (0 h) und am Ende der Behandlung (6 h) geerntet. Relative Transkriptlevel (RTL) wurden auf das Referenzgen *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* normalisiert. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

Zudem wurden stabile transgene Arabidopsis Reporterlinien hergestellt, welche die codierende Sequenz der Firefly Luciferase unter der Kontrolle des Promotors von *AtERF#111* exprimierten (*pBGWL7_prAtERF#111:fLUC*) (Abb. 14). 90 Minuten nach Verwundung der Blätter mit einer Schere konnte die Biolumineszenz in den Blättern der *prAtERF#111:fLUC* Linien festgestellt werden. Das Signal war ausschließlich an den verwundeten Stellen zu detektieren, während in den Blättern der Kontrollpflanze Col-0 kein Signal beobachtet werden konnte (Abb. 14). Dieser Versuch bestätigt demnach eine verwundungsabhängige Induktion von *AtERF#111* in den Blättern der Pflanze.

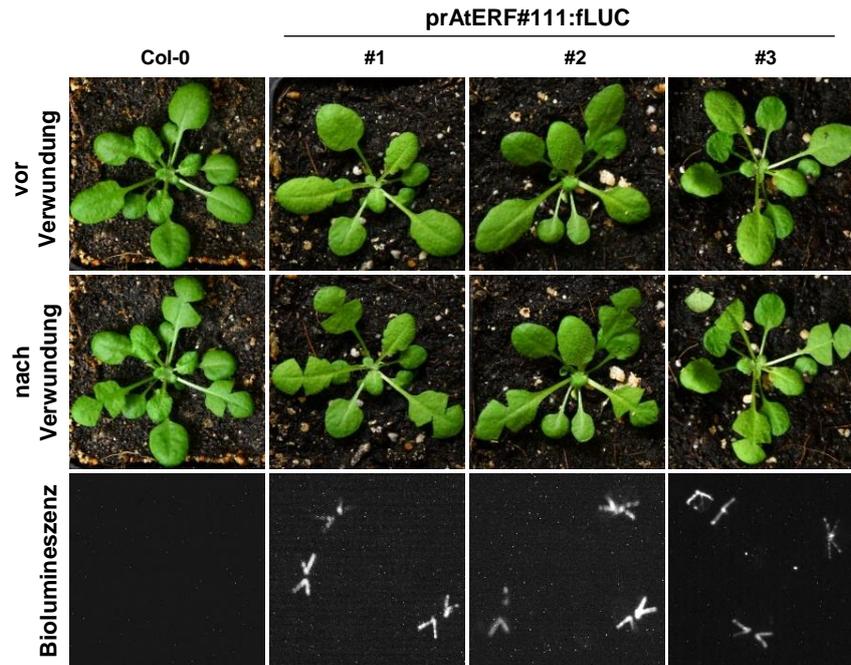


Abb. 14 | Verwundungsabhängige Induktion von *prAtERF#111::fLUC*.

Stabile Arabidopsis Linien im Col-0 Hintergrund, welche Fusionen aus dem Promotor von *AtERF#111* (1302 bp) und der codierende Sequenz von fLUC exprimieren (*prATERF#111::fLUC*). Detektion der Biolumineszenz nach Behandlung mit 2 mM D-Luciferin + 0,1 % Triton X-100 90 min nach Verwundung der Blätter mit einer Schere. Die Biolumineszenz wurde mittels CCD Kamera (Intas) und einer Belichtungszeit von 20 min optisch detektiert.

3.1.5 Analyse der Expression von *AtERF#111* unter weiteren Stressbedingungen

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits eine Induktion von *AtERF#111* bei Hypoxie, Überflutung und Verwundung detektiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob es noch weitere Bedingungen gibt, welche zur Induktion von *AtERF#111* führen. Sobald Pflanzen überflutet werden, akkumulieren sie in kürzester Zeit hohe Mengen an Ethylen – ein gasförmiges Phytohormon, das viele weitere Signalkaskaden anschaltet (Sasidharan et al., 2018). Nach Besprühen von 7 Tage-alten Keimlingen mit dem Ethylen-Vorläufer 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) konnte jedoch keine Änderung in der Transkriptmenge von *AtERF#111* festgestellt werden (Abb. 15).

Methyljasmonat (MeJA) induziert eine verwundungsresponsive Genexpression in Pflanzen und auch H_2O_2 wird systemisch in Blättern bei Verwundung induziert (León et al., 2001). Es konnte eine ca. 2-fache Induktion der *AtERF#111*-Expression nach H_2O_2 -Behandlung sowie eine 3,6-fache Induktion durch MeJA-Behandlung beobachtet werden (Abb. 15). Diese Befunde verstärken die Annahme, dass *AtERF#111* in die Verwundungsantwort involviert ist. Auch im Rahmen dieser Versuchsreihe konnte keine Induktion der Expression von *AtERF#111* durch eine ABA-Behandlung nachgewiesen werden.

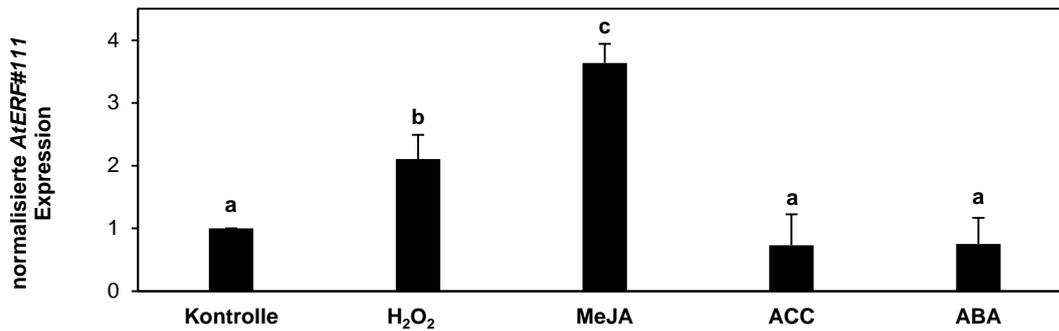


Abb. 15 | Expressionsanalyse von *AtERF#111* unter verschiedenen Stressbedingungen.

7 Tage-alte Keimlinge wurden mit 10 mM H₂O₂, 50 µM MeJA, 500 µM ACC oder 100 µM ABA besprüht. *AtERF#111*-Transkriptlevel wurden mittels RT-qPCR relativ zur Expression des Referenzgens *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* analysiert und auf die Kontrollbehandlungen (Ethanol bzw. Wasser) normalisiert. Zu jeder Behandlung wurden 0,01 % Tween-20 zugesetzt. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

3.1.6 *ERF#111* -OE Linien zeigen eine veränderte Wurzel- und Sprossentwicklung

Um die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors *AtERF#111* noch weiter aufzuklären, wurden stabile *ERF#111*-OE Linien mit einem N-terminalen His₆-FLAG-Epitop im Col-0 Hintergrund generiert. Interessanterweise wiesen die OE-Linien auffällige Phänotypen auf (Abb. 16). 5 Wochen-alte Pflanzen (Kurztag) bildeten kleinere Blätter und Petiolen im Vergleich zum WT und produzierten oft auch nur eine geringere Menge an Samen (Abb. 16A). Im Keimungsstadium bildeten sie im Vergleich zu Col-0 sehr viele und lange Wurzelhaare aus (Abb. 16B).

Mittels semiquantitativer RT-PCR sollte analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen Wurzelhaarbildung und der *AtERF#111* Transkriptmenge in verschiedenen starken OE-Linien besteht (Abb. 16C). Folglich wurden mehrere OE-Linien, hervorgegangen aus unabhängigen T-DNA Insertionsereignissen, ausgewählt und anhand ihrer Anzahl und Länge der Wurzelhaare eingeordnet. Die Analyse zeigte eine klare positive Korrelation zwischen Wurzelhaarbildung und *AtERF#111* Expression: OE-Linien, die ähnlich wie Col-0 vergleichsweise wenig Wurzelhaare ausbildeten, wiesen nur eine niedrige *AtERF#111*-Transkriptmenge auf, während die *AtERF#111*-Expression mit zunehmender Länge und Anzahl der Wurzelhaare anstieg (Abb. 16C). Auf Basis dieses Wurzelhaar-Phänotyps wurden für weitere Analysen die Linien OEI und OEII ausgewählt, wobei letztere mehr Wurzelhaare als OEI ausbildete und die stärkste *AtERF#111*-Expression aller getesteten Linien aufwies.

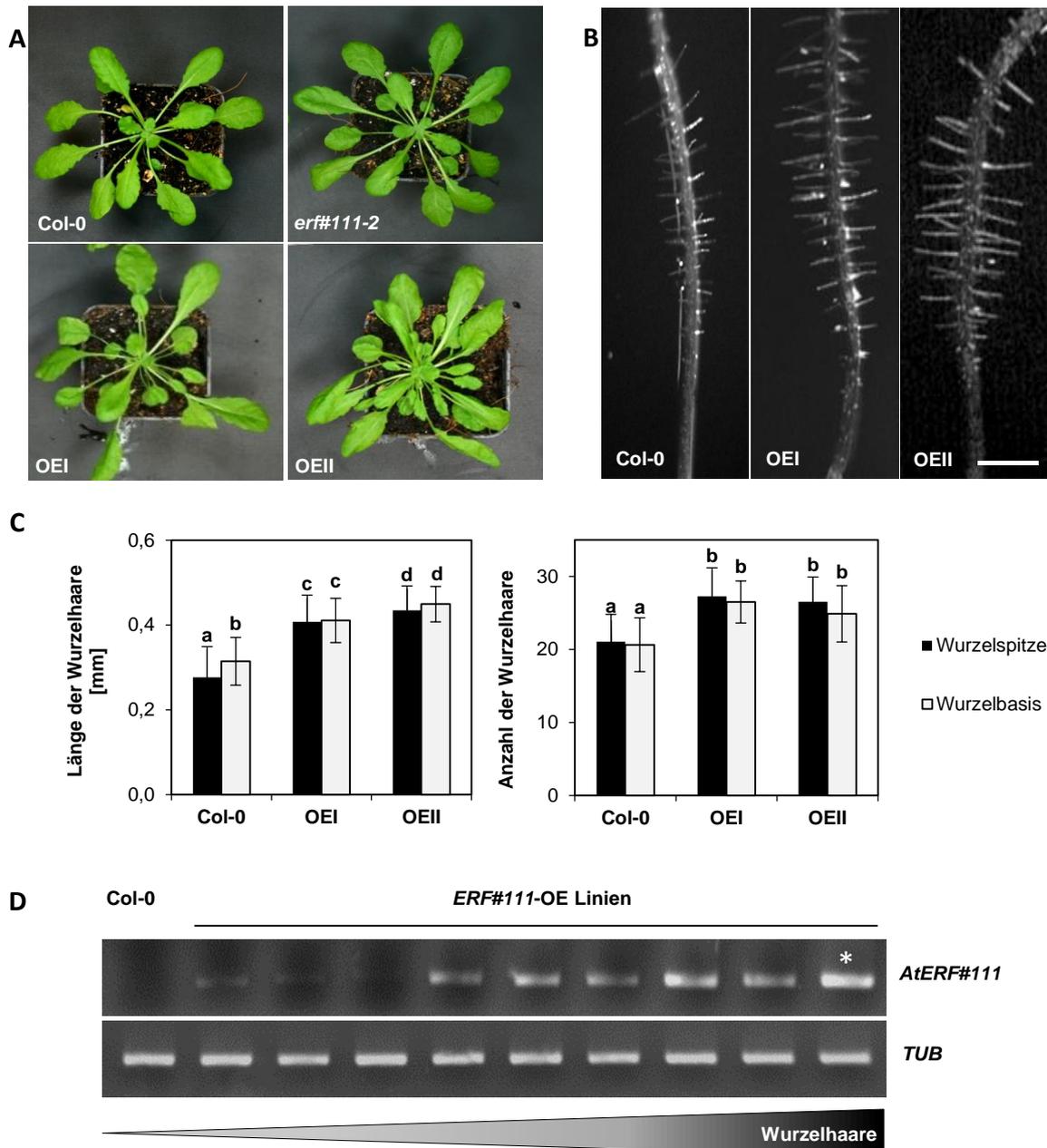


Abb. 16 | Phänotypen von *ERF#111*-Überexpressionslinien.

(A) 5 Wochen-alte Pflanzen (Kurztag) der *ERF#111*-OE Linien wiesen kleinere und mehr Rosettenblätter im Vergleich zu Col-0 auf. (B) 7 Tage-alte Keimlinge der *ERF#111*-OE Linien bildeten mehr Wurzelhaare als Col-0. Maßstab: 0,5 mm. (C) Länge ($n > 130$) und Anzahl ($n > 14$) der Wurzelhaare wurden an der Wurzelspitze (schwarze Balken) und Wurzelbasis (graue Balken) bestimmt. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test). (D) Korrelation zwischen der *AtERF#111* Transkriptmenge und der Wurzelhaarbildung. Semiquantitative RT-PCR Analyse von 7 Tage-alten Keimlingen verschiedener *ERF#111*-OE Linien und Col-0, die anhand der Anzahl und Länge der Wurzelhaare angeordnet wurden (*= OEII). *TUBULIN* (*TUB*) diente als Referenzgen.

Um die Zellverteilung in der Rhizodermis der Wurzel genauer zu untersuchen, wurden zudem Wurzelschnitte von 7 Tage-alten Keimlingen angefertigt (Abb. 17). Normalerweise bilden Kreuzblütler wie *Arabidopsis* Wurzelhaare nur an bestimmten Positionen aus: Zellen, welche dazu bestimmt sind, Wurzelhaare zu bilden (Trichoblasten), haben Kontakt zu zwei kortikalen Zellen, bekannt als die Haar-Position (H), während Zellen, die keine Wurzelhaare ausbilden (Atrichoblasten), nur Kontakt zu einer kortikalen Zelle aufweisen, was die sogenannte Nicht-Haar-Position (N) darstellt (Dolan et al., 1994). Interessanterweise konnten Mikrotomschnitte von Wurzeln der *ERF#111*-OE Linien zeigen, dass die Wurzelhaare nicht nur in der Haar-Position, sondern auch in der Nicht-Haar-Position ausgemacht werden konnten, welche normalerweise keine Wurzelhaare ausbildet (Abb. 17). Wie erwartet bildete Col-0 ausschließlich Wurzelhaare in der Haar-Position.

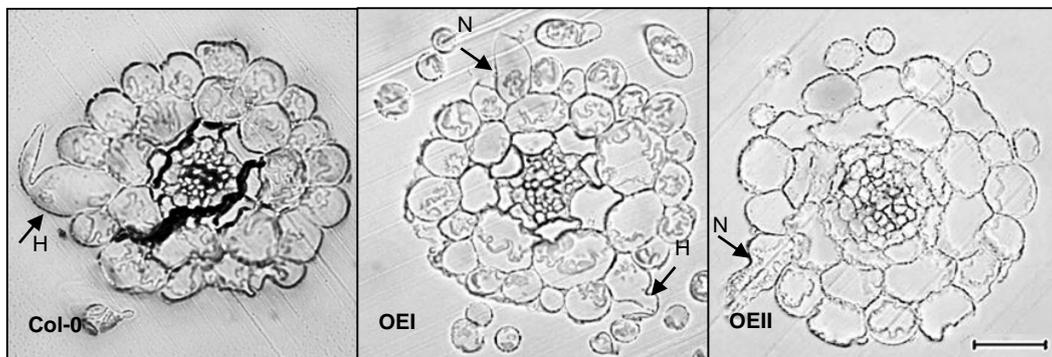


Abb. 17 | Querschnitte von Wurzeln der *ERF#111*-Überexpressionslinien und Col-0.

Repräsentative Aufnahmen von Mikrotomschnitten (15 μm) der Wurzeln von 7 Tage alten Keimlingen. *ERF#111*-OE Linien bilden im Unterschied zu Col-0 Wurzelhaare nicht nur in den Haar-Positionen (H), welche Kontakt zu zwei kortikalen Zellen aufweisen, sondern auch in den Nicht-Haar-Positionen (N), welche Kontakt zu nur einer kortikalen Zelle aufweisen. Maßstab: 25 μm .

3.1.7 Erstellung von Genexpressionsprofilen von *ERF#111*-Überexpressionslinien

Um herauszufinden, welchen Effekt eine Überexpression von *ERF#111* auf die Genexpression der Pflanze ausübt, wurde ein entsprechendes Expressionsprofil mittels Mikroarrayanalyse unter der Verwendung des *Arabidopsis* 4x44k Array (Agilent Technologies) angefertigt. Dafür wurden Spross und Wurzel von 7 Tage-alten *His₆-FLAG-ERF#111*-OEI und -OEII getrennt geerntet und die Expression mit Spross und Wurzel von WT-Keimlingen verglichen (Abb. 18).

Insgesamt konnten dabei 807 differentiell exprimierte Gene (DEGs) identifiziert werden, deren Transkriptmenge im Vergleich zu Col-0 eine mehr als 2-fache Änderung aufwies ($|\text{Signal-Log}_2\text{-Ratio (SLR)}| > 1, p < 0,01$) (Abb. 18A). Von diesen waren 277 Gene nur im Spross, 116 nur in der Wurzel und 57 Gene in Wurzel und Spross zusammen induziert. Darüber hinaus waren 357 der 807 DEGs signifikant herunterreguliert ($\text{SLR} < -1, p < 0,01$), 128 Gene nur im Spross, 222 in der Wurzel und 7 in Spross und Wurzel zusammen (Abb. 18A).

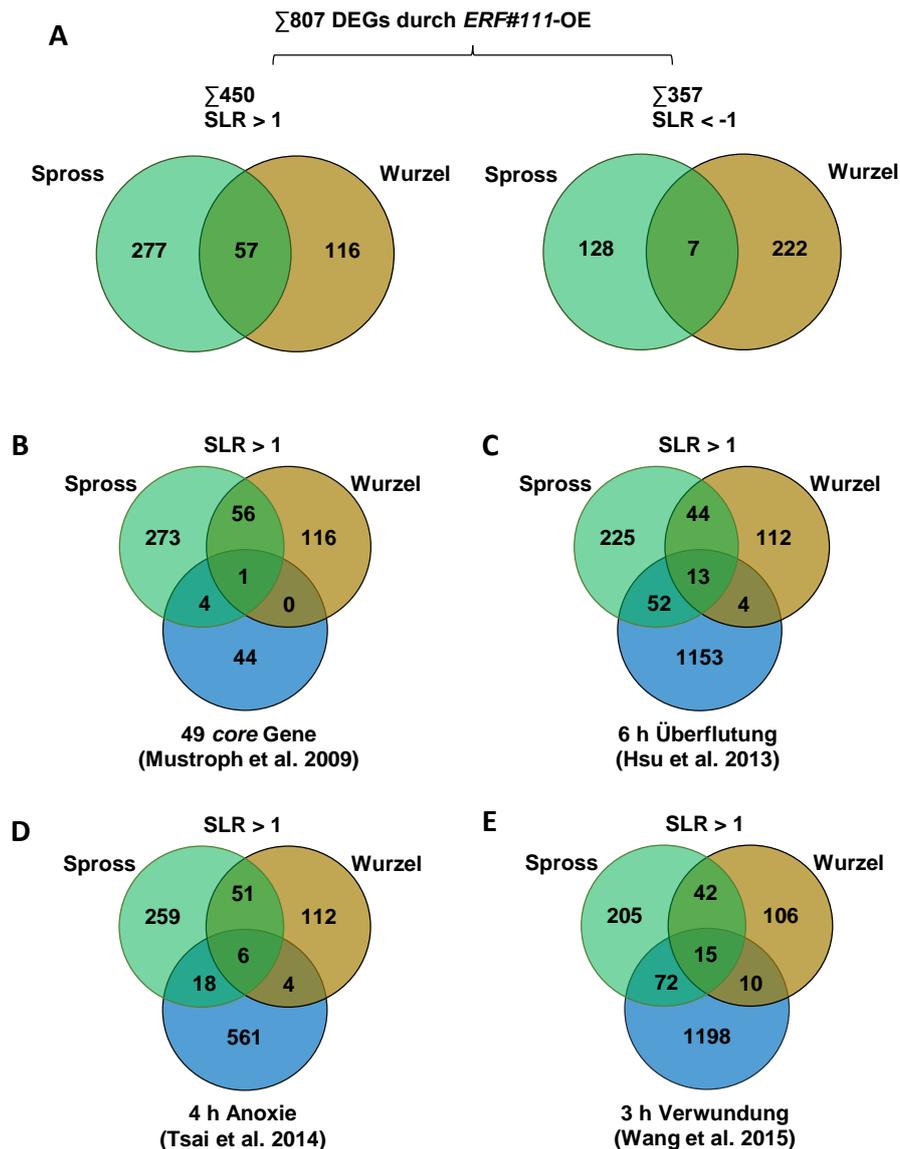


Abb. 18 | Venn-Diagramme der Mikroarraydaten von *ERF#111*-OE Linien.

(A) Anzahl an differentiell exprimierten Genen (DEGs), die im Spross von 7 Tage alten Arabidopsis *ERF#111*-OE Keimlingen signifikant hochreguliert (SLR > 1, $p < 0,01$) oder signifikant herunterreguliert (SLR < -1, $p < 0,01$) wurden. (B-E) Vergleich der durch *ERF#111*-OE induzierten Gene in Wurzel und Spross (SLR > 1, $p < 0,01$) mit bereits publizierten Mikroarray-Datensätzen: (B) mit den 49 Hypoxie-responsiven *core*-Genen (Mustroph et al. 2009); (C) mit Keimlingen, die für 6 h überflutet wurden (Hsu et al. 2013); (D) mit Keimlingen nach 4 h Anoxie (Tsai et al. 2014); (E) mit den Daten nach 3 h Verwundung von Blättern (Wang et al. 2015).

Um einer potentiellen Verbindung zu der anaeroben Antwort bei Sauerstoffmangel nachzugehen, wurden alle durch *ERF#111*-OE signifikant hochregulierten Gene mit dem gut charakterisierten Set von 49 Hypoxie-responsiven *core*-Genen (Mustroph et al., 2009) verglichen (Abb. 18B). Es konnte nur ein *core*-Gen, *RHODANESE* (*AT2G17850*), identifiziert werden, das ebenfalls durch *ERF#111*-OE in Wurzel und Spross hochreguliert wurde sowie vier weitere *core*-Gene, welche nur im Spross hochreguliert wurden.

Letztere waren zwei *Wound Responsive Family Proteins* (*AT4G33560*, *AT4G10270*), *PYRUVATE DECARBOXYLASE 1* (*PDC1*, *At4G33070*) und *ETHYLENE RESPONSE2* (*ETR2*, *AT3G23150*).

Beim Vergleich aller DEGs mit einem SLR > 1 mit Mikroarraydaten von Arabidopsis-Keimlingen, die für 6 h in Dunkelheit überflutet wurden (Hsu et al., 2013) (Abb. 18C, Abb. 19A) oder 4 h der Anoxie ausgesetzt wurden (Tsai et al., 2014) (Abb. 18C, Abb. 19A), konnte eine sprossspezifische Überlappung zwischen diesen Datensätzen ermittelt werden (jeweils *4x44k Array*). Diese Überlappung war statistisch signifikant ($p < 0,001$, *Fishers exact test*), was eine potentielle Verbindung zu Überflutung/Hypoxie impliziert. Das Hypoxie-responsive Gen *RHODANESE* war dabei in allen Datensätzen hochreguliert.

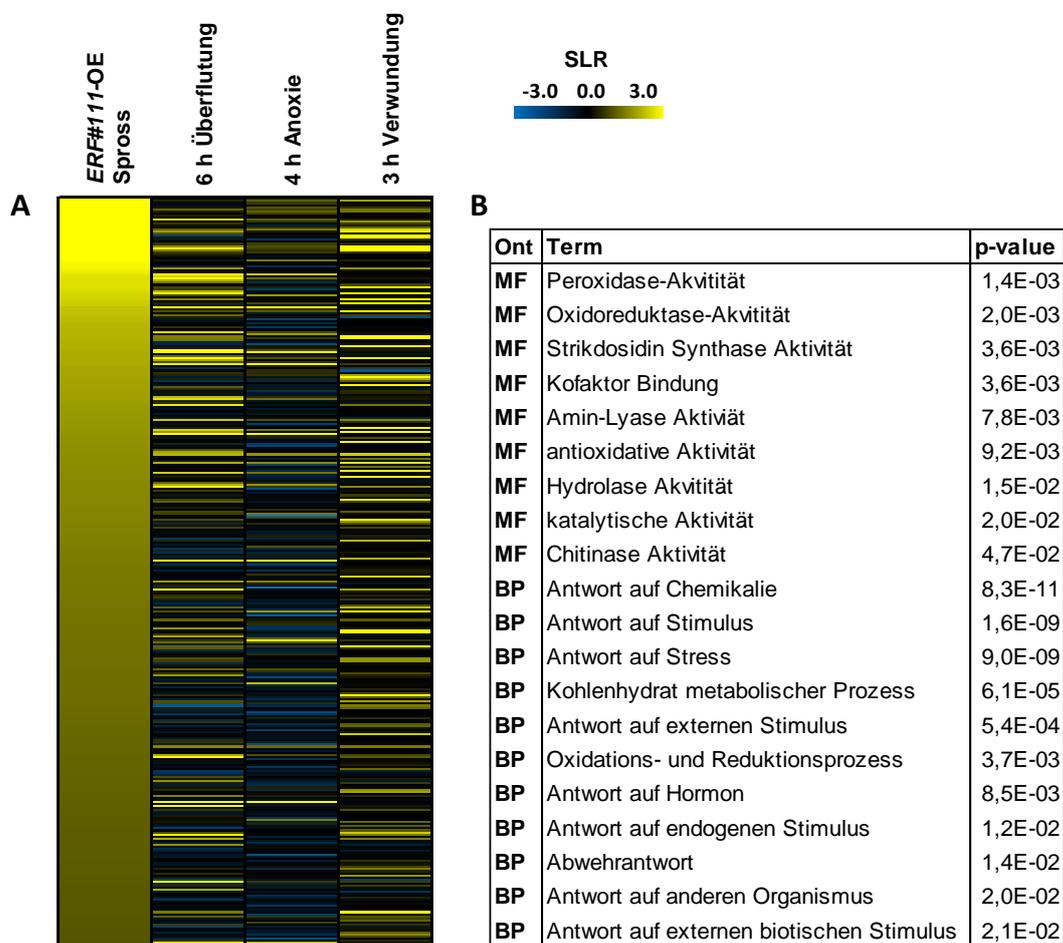


Abb. 19 | Heatmap und Gene-Ontology Analyse der Mikroarraydaten von ERF#111-OE Linien.

(A) Heatmap von sprossspezifischen DEGs, die durch *ERF#111-OE* induziert wurden im Vergleich zu Mikroarraydaten von Arabidopsis-Keimlingen nach 6 h Überflutung in Dunkelheit (Hsu et al. 2013), nach 4 h Anoxie (Tsai et al. 2014) oder von Blättern, die 3 h nach Verwundung geerntet wurden (Wang et al. 2015). *Signal-Log2-Ratios* (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt. **(B)** Ausgewählte *Gene-Ontology* (GO) Kategorien für molekulare Funktion (MF) und biologischen Prozess (BP), signifikant im Spross durch *ERF#111-OE* überrepräsentiert (*P-values* wurden mittels GOHyperGAll berechnet).

Da die Expression von *AtERF#111* zudem stark durch Verwundung induziert wurde (Abb. 13, Abb. 14), folgte ein Vergleich der Daten mit einem bereits publizierten Mikroarrayexperiment, bei welchem die Expression in Blättern der Pflanzen 3 h nach der Verwundung ebenfalls mittels *4x44k Array* analysiert wurde (Wang et al., 2015). In Übereinstimmung konnte auch bei Wang et al. (2015) eine Induktion von *AtERF#111* bei Verwundung gezeigt werden. Zudem war die Überlappung der durch *ERF#111-OE* induzierten Gene und der im Verwundungsarray von Wang et al. (2015) induzierten Gene statistisch signifikant ($p < 0.001$, *Fishers exact test*). Darunter befanden sich zum einen die Mitglieder der Pflanzen-Defensine, aber auch die Gene *Thioredoxin H-type 8 (AtTH8; AT1G69880)* oder *Strictosidine synthase 3 (AtSS3; AT1G74000)*. Die Vermutung, dass *AtERF#111* eine Funktion in der Abwehr- oder Verwundungsantwort haben könnte, wurde zudem durch die Tatsache gestützt, dass die Mitglieder der Klasse I Pflanzen-Defensine *PLANT DEFENSINS (AtPDF)1.2c (AT5G44430; SLR 6.9)*, *AtPDF1.3 (AT2G26010; SLR 6.5)*, *AtPDF1.2b (AT2G26020; SLR 6.1)* und *AtPDF1.2a (AT5G44420; SLR 4.5)* zu den durch *AtERF#111* am stärksten induzierten Genen im Spross gehörten. Die Transkripte dieser zeigten jedoch keine Änderung bei Überflutung oder Hypoxie (Referenzen aus Abb. 19).

Um weiterhin Aufschluss darüber zu erlangen, welchem biologischen Prozess (BP) oder welcher molekularen Funktion (MF) die durch *ERF#111-OE* induzierten Gene zugeordnet werden können, wurde eine *Gene-Ontology (GO)* Analyse durchgeführt (Abb. 19B). Die meisten angereicherten GO-Annotationen konnten den sprossspezifischen DEGs zugeordnet werden, darunter die molekularen Funktionen Peroxidase-Aktivität, Oxidoreduktase-Aktivität, Strictosidin-Synthase-Aktivität sowie biologische Prozesse, die mit externen Stimuli in Verbindung gebracht werden konnten, wie Antwort auf Stress, Chemikalien, Hormone, Abwehr oder auf einen anderen Organismus (Abb. 19B). Diese Befunde unterstützten weiterhin die Annahme, dass *AtERF#111* eine Rolle in der Verwundungsantwort spielt.

3.1.8 Identifikation von direkten *AtERF#111*-Zielgenen

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Charakterisierung von *AtERF#111* war die Identifizierung von Zielgenen, welche direkt durch den Transkriptionsfaktor reguliert werden. Um dies zu erreichen, sollte zunächst die Genexpression zwischen Col-0 und der *erf#111-2* Mutante im Rahmen eines weiteren Mikroarrayexperiments nach Verwundung verglichen werden (Abb. 20).

Hierfür wurden die Blätter von 3 Wochen-alten Arabidopsis-Pflanzen verwundet und das Blattmaterial nach 3 Stunden geerntet, analog zu den Experimenten von Wang et al. (2015). Beim Vergleich der Daten aus dem bereits publizierten Verwundungsarray (Wang et al. 2015) mit den nun neu generierten Daten von Col-0 nach Verwundung konnte eine klare Überlappung festgestellt werden: 448 von 1415 differentiell exprimierten Genen wurden auch bei Wang et al. (2015) durch Verwundung induziert (Abb. 20A).

Interessanterweise konnten 328 Gene identifiziert werden, die zwar signifikant durch Verwundung in Col-0 (SLR > 1, $p < 0,01$), jedoch nicht signifikant in *erf#111-2* induziert wurden (vgl. Daten S1).

Eines dieser Gene war natürlich *AtERF#111* selbst, was einen Funktionsverlust des Gens bestätigt. Nichtsdestotrotz waren die Unterschiede der Genexpression zwischen WT und *erf#111-2* nicht groß genug, sodass kein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich zwischen WT und *erf#111-2* detektiert werden konnte. Das könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass nicht der richtige Zeitpunkt nach Verwundung ausgewählt wurde oder, dass *AtERF#111* nicht den einzigen Regulator putativer Zielgene bei Verwundung darstellt und der Effekt von redundant agierenden Transkriptionsfaktoren kompensiert wird, was wahrscheinlicher erscheint.

Um die Fragestellung potentieller direkter Zielgene dennoch beantworten zu können, wurde ein anderer experimenteller Ansatz im Protoplastensystem verfolgt. Hierfür wurde ein Glukokortikoid-Rezeptor C-terminal an *AtERF#111* fusioniert (*AtERF#111-HBD*) und in Arabidopsis-Protoplasten der *erf#111-2* Mutante exprimiert. In diesem System wurde die nukleare Translokation von *ERF#111-HBD* durch die Zugabe des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason (DEX) zur Protoplastensuspension induziert. Der Effekt der Dexamethason-Behandlung auf die Expression der Zielgene wurde in der An- bzw. Abwesenheit des Translationsinhibitors Cykloheximid (CHX) analysiert, um eine Unterscheidung von direkten und indirekten *AtERF#111*-Zielgenen zu ermöglichen. 4 h nach Zugabe von DEX wurde aus den Protoplasten RNA für einen anschließenden Mikroarray extrahiert. Hierbei konnten 309 Gene identifiziert werden, welche die Summe aus direkten und indirekten Zielgenen darstellten (nur DEX-Behandlung) sowie 109 Gene, die sehr wahrscheinlich direkte *AtERF#111*-Zielgene darstellen (CHX + DEX Behandlung) (Abb. 20B).

Bei Betrachtung der direkten Zielgene konnte zudem festgestellt werden, dass die Expression aller Zielgene signifikant hochreguliert wurde und keines signifikant herunterreguliert. Dies lässt den wichtigen Schluss zu, dass *AtERF#111* als ein Aktivator der Genexpression fungiert und nicht als ein Repressor, wie zuvor von Pandey et al. (2005) publiziert. Beim Vergleich der verschiedenen Mikroarraydaten konnten 15 direkte *AtERF#111*-Zielgene identifiziert werden, deren Expression sowohl durch Verwundung als auch durch stabile *AtERF#111*-Überexpression modifiziert wurde (Abb. 20C).

Darunter befanden sich erneut die Gene *SS3* und *TH8*, aber auch das *CYTOCHROME P450 CYP71B22* (*AT3G26200*). Eine GO-Analyse aller direkten *AtERF#111*-Zielgene zeigte eine Anreicherung der folgenden biologischen Prozesse: Antwort auf externen Stimulus, Abwehrantwort, Antwort auf Verwundung und Antwort auf einen anderen Organismus (Abb. 20D) – ähnlich zu den GO-Kategorien, die durch *ERF#111*-OE im Spross identifiziert wurden.

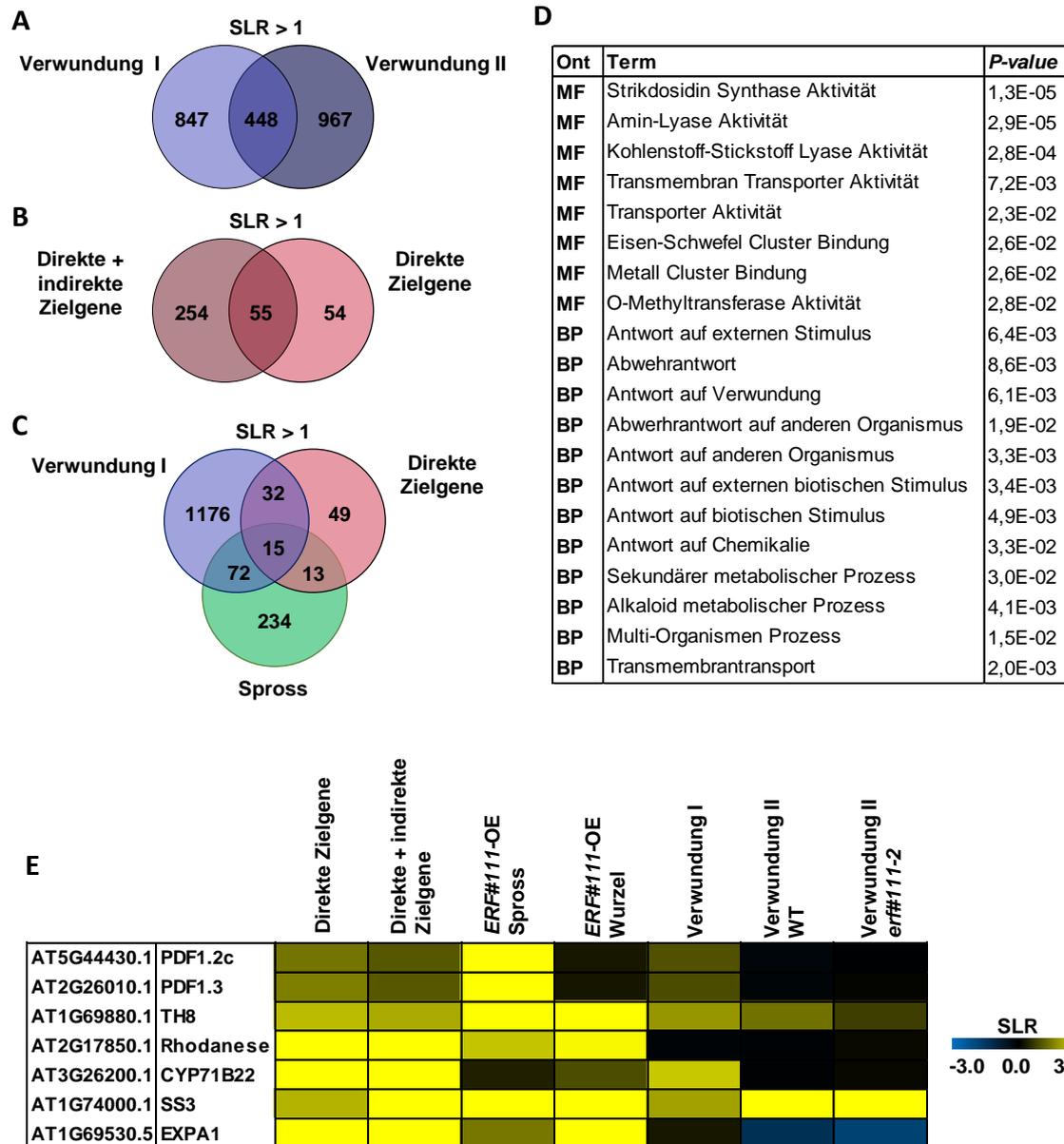


Abb. 20 | Identifikation von direkten AtERF#111-Zielgenen.

A) Anzahl an DEGs (SLR < 1, $p < 0,01$) im Verwundungs-Mikroarray von Wang et al. (2015) (Verwundung I) und dem in im Rahmen dieser Arbeit neu durchgeführten Verwundungs-Mikroarray (Verwundung II). Pflanzenmaterial wurde in beiden Arrays 3 h nach Verwundung der Blätter geerntet. **B)** Anzahl an direkten sowie direkten + indirekten AtERF#111-Zielgenen, die mittels Glukokortikoid-induzierbaren Protoplastensystem identifiziert wurden. **C)** Venn-Diagramm mit überlappenden Genen zwischen Verwundung I, AtERF#111-Zielgenen sowie Genen, die durch ERF#111-OE im Spross induziert wurden. **D)** Ausgewählte GO-Kategorien für Molekulare Funktion (MF) und Biologischen Prozess (BP), überrepräsentiert in allen direkten AtERF#111-Zielgenen (P -values wurden mittels GOHyperGAll bestimmt). **E)** Heatmap ausgewählter Gene zum Vergleich folgender Gruppen: direkte Zielgene, direkte + indirekte Zielgene, ERF#111-OE in Wurzel und Spross, Verwundung I und Verwundung II (von WT und erf#111-2). Signal-Log₂-Ratios (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt.

3.1.9 AtERF#111 transaktiviert die Promotoren ausgewählter Zielgene

Als nächstes sollte das Transaktivierungspotential von AtERF#111 auf die Promotoren ausgewählter Zielgene im Protoplastensystem untersucht werden. Dafür wurde das Konstrukt 35S:HA-AtERF#111 zusammen mit dem Promotor des Zielgens, welcher an das *Firefly* Luciferase-Gen (fLUC) fusioniert wurde, in Mesophyllprotoplasten von Arabidopsis transformiert. Renilla Luciferase (rLUC) wurde dabei als interner Standard verwendet, und die Promotoraktivität wurde als Quotient aus fLUC und rLUC (fLUC/rLUC) bestimmt. Ausgewählt wurden für diesen Versuch die zuvor genannten verwundungs-responsiven Gene *PDF1.2a*, *TH8*, *SS3* und *CYP71B22* (Abb. 20E). Zusätzlich wurde das Hypoxie-responsive *core* Gen *RHODANESE* sowie das Gen *EXPANSIN 1* (*EXPA1*) ausgewählt. Bei Letzterem wird davon ausgegangen, dass es in die Auflockerung der Zellwand involviert sein könnte, was möglicherweise zur Erklärung des Wurzelhaar-Phänotyps der *ERF#111*-OE Linien beiträgt. Abgesehen von *SS3* konnte für alle getesteten Zielpromotoren eine signifikante Aktivierung durch AtERF#111 detektiert werden (Abb. 21). Dies bestätigt, dass AtERF#111 einen Aktivator der Genexpression darstellt.

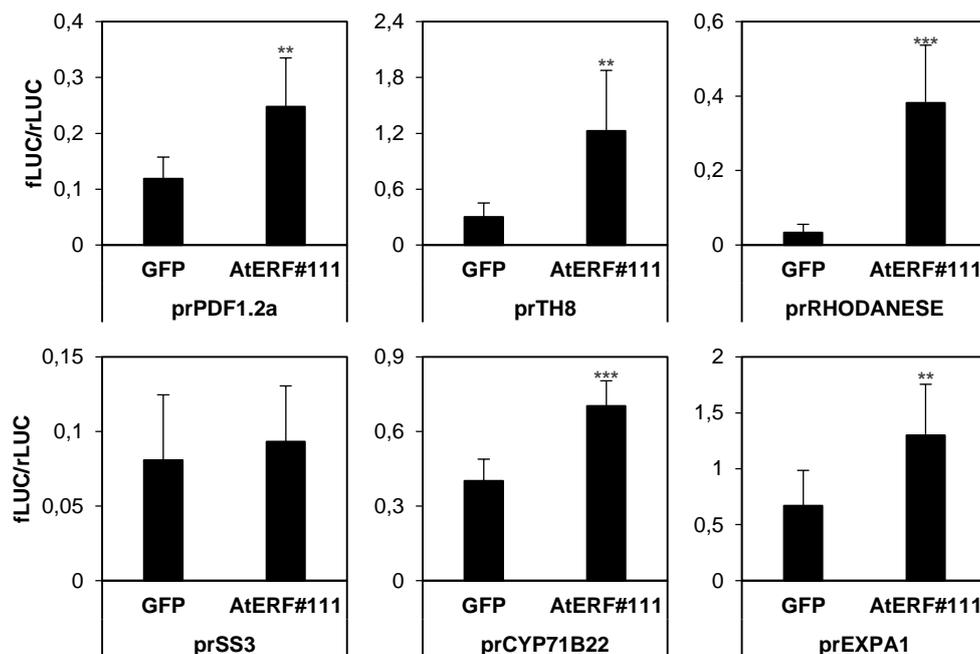


Abb. 21 | AtERF#111 transaktiviert die Promotoren ausgewählter Zielgene.

Die Luciferase (LUC) Aktivität wurde in Mesophyllprotoplasten der Arabidopsis Mutante *erf#111-2* gemessen, welche transient die Effektoren GFP (Kontrolle) oder AtERF#111 in Kombination mit entsprechenden Promotoren (prPDF1.2a, prTH8, prRHODANESE, prCYP71B22, prSS3, prGST6 and prEXPA1) exprimierten, welche an die codierende Sequenz der *Firefly* Luciferase (fLUC) fusioniert wurden. Die Promotoraktivität wurde quantifiziert, indem die fLUC Aktivität relativ zu der cotransformierten *Renilla* Luciferase (rLUC) als fLUC/rLUC ermittelt wurde. Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test). Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ (T-Test).

Um die Zielgene von AtERF#111 weiter zu bestätigen, wurde im Anschluss die Expression dieser in Col-0 und *erf#111-2* unter Kontrollbedingungen sowie ausgewählten Stressbedingungen mittels RT-qPCR untersucht (Abb. 22). *RHODANESE* und *SS3* wurden zwar unter Verwundung induziert, jedoch konnte nur eine leicht verminderte Expression in der *erf#111-2* Mutante im Vergleich zu Col-0 detektiert werden. *CYP71B22* zeigte 3 h nach Verwundung keine Änderung in der Transkriptmenge in beiden Genotypen. Um die Expression von Mitgliedern der Familie der Pflanzen Defensine zu testen, wurden Oligonukleotide generiert, welche *PDF1.1-1.3* aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit simultan amplifizieren. Interessanterweise war die Expression von *PDF1.1-1.3* in *erf#111-2* signifikant niedriger im Vergleich zum WT, jedoch zeigte die Genfamilie keine Induktion bei Verwundung unter

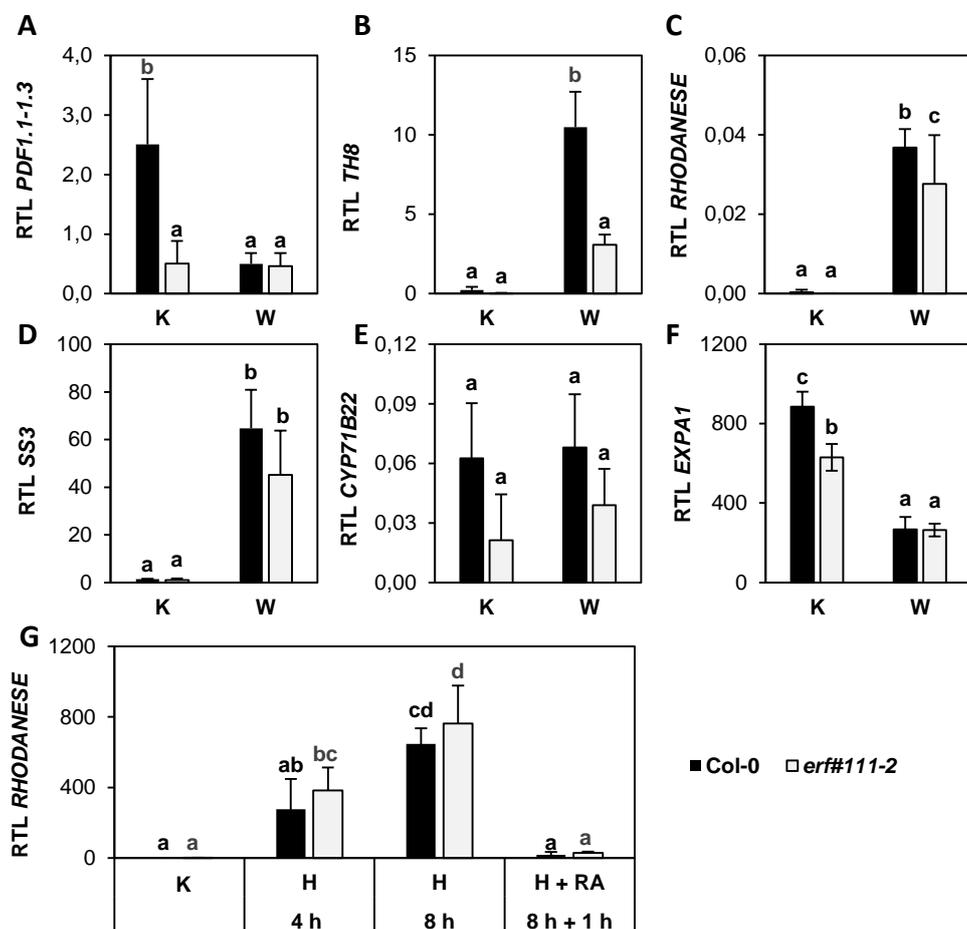


Abb. 22 | Analyse der Expression von AtERF#111 Zielgenen in Col-0 und *erf#111-2* nach Stressbehandlungen.

(A) – (F) RT-qPCR Analyse der relativen Transkriptlevel (RTL) von TH8, RHODANESE, SS3, CYP71B22 und EXPA1 in Blättern 3 Wochen-alter Col-0 und *erf#111-2* Pflanzen. Vergleich der Blätter von Kontrollpflanzen (K) zu Blättern von Pflanzen 3 h nach Verwundung (W). (G) RT-qPCR Analyse des RTL von RHODANESE in 7 Tage-alten Keimlingen, die für 4 h und 8 h mit Hypoxie (H) behandelt wurden sowie 8 h H gefolgt von 1 h bzw. 16 h Wiederbelüftung (RA). Kontrollen (K) wurden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Relative Transkriptlevel wurden auf das Referenzgen *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* normalisiert. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

den getesteten Bedingungen. Das Gleiche galt für *EXPA1*, welches auch eine geringere Expression in *erf#111-2* im Vergleich zum WT unter Kontrollbedingungen aufwies. Dies deutet darauf hin, dass AtERF#111 die Expression dieser beiden Gene bereits unter Kontrollbedingungen reguliert. Ein Gen, welches signifikant weniger in der *erf#111-2* Mutante im Vergleich zu Col-0 induziert wurde, war jedoch *TH8*. Eine Tendenz diesbezüglich konnte auch in den generierten Mikroarraydaten beobachtet werden: TH8 wurde signifikant durch Verwundung im WT induziert, aber nicht signifikant in *erf#111-2*. Nichtsdestotrotz wurde die Expression von *TH8* in *erf#111-2* nicht vollständig im RT-qPCR Experiment reduziert, was darauf hindeutet, dass AtERF#111 nicht den einzigen Regulator dieses Gens darstellt. Da die Expression von RHODANESE sehr stark durch Hypoxie induziert wird, wurde demnach auch die Transkriptmenge nach 4 und 8 h Hypoxie bzw. 8 h Hypoxie gefolgt von einer Stunde Wiederbelüftung analysiert. Auch hier konnten keine signifikanten Expressionsänderungen zwischen WT und *erf#111-2* ausgemacht werden, dennoch konnte eine Induktion dieses Gens unter Hypoxie bestätigt werden. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass AtERF#111 keinen alleinigen Regulator der Verwundungsantwort darstellt. Tatsächlich werden einige weitere Mitglieder der GXERFs in Arabidopsis auch sehr stark durch Verwundung induziert, unter anderem ERF#108/RAP2.6, ERF#109/RRTF1, ERF#112, ERF#113/RAP2.6L, ERF#114 und ERF#115 (Abb. 23, Ikeuchi et al. 2017). Gemeinsam mit AtERF#111 könnten diese demnach zur transkriptionellen Regulation der Verwundungsantwort beitragen.

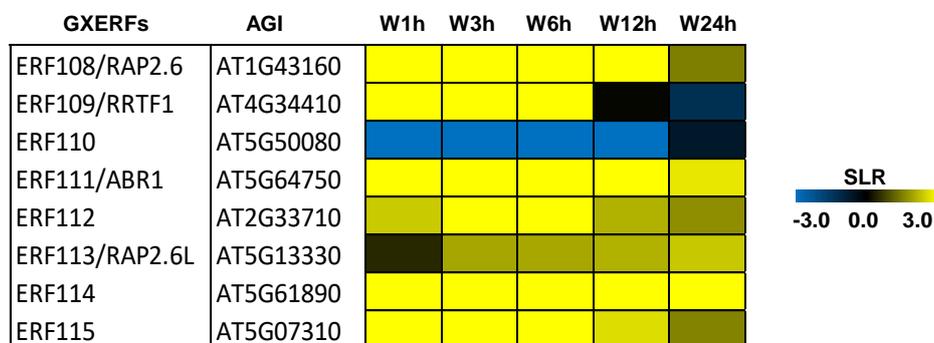


Abb. 23 | Die Expression von GXERFs bei Verwundung.

RNA-Seq Daten (GEO accession: GSE101422) stammen von Ikeuchi et al. (2017). Etiolierte Hypokotyle wurden abgeschnitten und in Dunkelheit für 1, 3, 6, 12 und 24 h auf MS-0 Platten inkubiert. *Signal-Log2-Ratios* (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt.

3.2 Charakterisierung des Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktors AtLBD41

3.2.1 Analyse der Expression von *AtLBD41* bei Überflutung

AtLBD41 zählt zu der Gruppe von 49 *core* Hypoxie-responsiven Genen und wird in *A. thaliana* sehr stark durch Sauerstoffmangel induziert (Mustroph et al., 2009). Damit übereinstimmend konnte auch bei Überflutung in Dunkelheit eine Induktion der Expression des Transkriptionsfaktors gezeigt werden (van Veen et al., 2016).

Um die Expression bei Überflutung noch detaillierter zu analysieren und auch die Verfügbarkeit von Licht mit einzubeziehen, wurde im Folgenden ein weiteres Überflutungsexperiment durchgeführt. Dazu wurden drei Wochen-alte Arabidopsis Col-0 Pflanzen 2 h nach Beginn der Photoperiode für 22 h bzw. 24 h entweder unter normalen Kurztagbedingungen oder in kompletter Dunkelheit überflutet und die Expression von *AtLBD41* mittels RT-qPCR im Spross analysiert (Abb. 24A, B). Als Kontrollen dienten Pflanzen, die für die gleiche Zeitdauer unter normalen Kurztagbedingungen inkubiert wurden (Kontrolle KT), sowie Pflanzen, die für die gesamte Dauer in Dunkelheit inkubiert wurden (Kontrolle Dunkel).

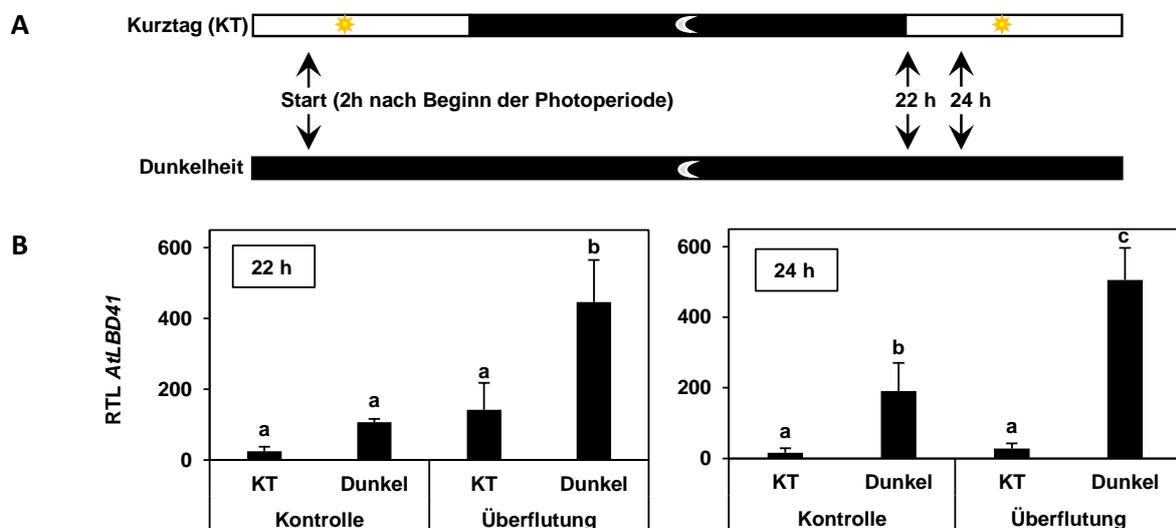


Abb. 24 | Analyse der Expression von *AtLBD41* bei Überflutung in Abhängigkeit von der Lichtverfügbarkeit.

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Col-0 Pflanzen wurden im 10-Blattstadium 2 h nach Beginn der Photoperiode im Kurztag (KT) entweder unter normalen KT-Bedingungen oder in kompletter Dunkelheit überflutet. Kontrollen wurden für die gleiche Zeit und Bedingungen an der Luft inkubiert. Nach 22 h bzw. 24 h wurde das Blattmaterial geerntet (pro Bedingung wurde das Material von zwei Pflanzen vereint). **(B)** Relative Transkriptlevel (RTL) wurden mittels RT-qPCR analysiert und auf das Referenzgen *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* normalisiert. Datenpunkte sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

Interessanterweise wurde die Expression von *AtLBD41* schon alleine durch Dunkelheit signifikant induziert. Die Kombination aus Dunkelheit und Überflutung hatte dabei den größten Effekt. Pflanzen, die im normalen KT-Rhythmus überflutet werden, zeigten nach 22 h, also am Ende der Nacht, eine Induktion von *AtLBD41*, nach 24 h und damit 2 h erneuter Lichtexposition jedoch nicht mehr. Dieser Vergleich verdeutlicht, dass bei Überflutung im Licht womöglich noch so viel Photosynthese betrieben werden kann, dass kein Sauerstoffmangel vorherrscht und die Lichtverfügbarkeit maßgeblich den Zustand der Hypoxie beeinflusst. Daher konnte hiermit gezeigt werden, dass *AtLBD41* hauptsächlich bei Überflutung in Dunkelheit induziert wird.

3.2.2 *AtLBD41* agiert als Repressor

Da *AtLBD41* eine vorhergesagte EAR-Domäne am C-Terminus besitzt (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009), reprimiert der Transkriptionsfaktor höchstwahrscheinlich die Transkription seiner Zielgene.

Einhergehend mit einer Funktion als Repressor konnten in einem Protoplastenversuch keine Transaktivierungseigenschaften für *AtLBD41* detektiert werden. Im Zuge dieses Experiments wurde der Effektor *AtLBD41* N-terminal mit der DNA-Bindedomäne (BD-*AtLBD41*) des transkriptionellen Aktivators GAL4 aus Hefe fusioniert und analysiert, inwieweit dieser die Transkription des Reporters 4xGAL4UAS:LUC induzieren konnte (Abb. 25). Im Gegensatz zur Positivkontrolle BD-*AtRAP2.2*, bei welchem es sich um einen transkriptionellen Aktivator handelt (Hinz et al., 2010; Gasch et al., 2016), konnten für BD-*AtLBD41* keine Transaktivierungseigenschaften im Vergleich zur Kontrolle BD-GFP detektiert werden.

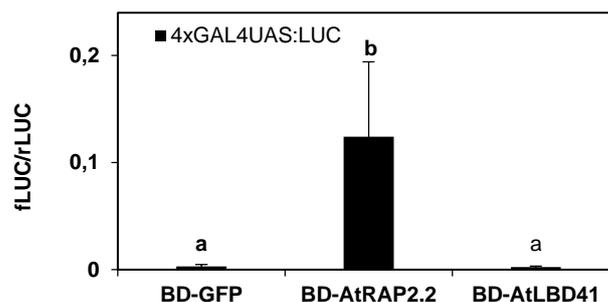


Abb. 25 | *AtLBD41* besitzt keine Transaktivierungseigenschaften.

Die Luciferase (LUC) Aktivität wurde in Mesophyll-Protoplasten von Col-0 gemessen, welche transient die Effektoren BD-*AtRAP2.2*, BD-*AtLBD41* und die Kontrolle BD-GFP exprimierten. Als Reporter wurde 4xGAL4UAS:LUC coexprimiert. Die Transaktivierungskapazität wurde quantifiziert, indem die fLUC Aktivität relativ zu der cotransformierten Renilla Luciferase (rLUC) als fLUC/rLUC ermittelt wurde. Die Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

3.2.3 Identifikation putativer Zielgene von AtLBD41

Als einer der ersten Schritte hin zu Charakterisierung von AtLBD41 war es das Ziel, mögliche Zielgene zu identifizieren. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits zwei Versionen des Transkriptionsfaktors kloniert, um den Effekt einer Überexpression in Protoplasten auf das gesamte Transkriptom analysieren zu können: zum einen das native AtLBD41 (WT_AtLBD41) und zum anderen AtLBD41ΔEAR:VP16, bei welchem die EAR-Domäne durch die aktivierende VP16-Domäne aus *Herpes simplex* ersetzt wurde (Abb. 26). Es wurde bereits gezeigt, dass eine Fusion mit der Aktivator-domäne VP16 Transkriptionsfaktoren konstitutive Aktivierungseigenschaften verleiht (Bensmihen et al., 2004; Silveira et al., 2007). Die beiden Konstrukte wurden transient in Mesophyllprotoplasten von *A. thaliana* Col-0 transformiert



Abb. 26 | Generierung eines putativ aktivierenden Konstrukts von AtLBD41.

Zur Herstellung von AtLBD41ΔEAR:VP16 wurden die letzten 49 Aminosäuren inklusive der EAR Domäne (KLDLTL) vom wildtypischen AtLBD41 durch eine aktivierende VP16 Domäne aus *Herpes simplex* ersetzt. WT_AtLBD41 und AtLBD41ΔEAR wurden in die Vektoren p35S:GW:HA bzw. p35S:GW-VP16:HA kloniert.

und anschließend RNA für eine Mikroarrayanalyse extrahiert, wobei als Kontrolle p35S:HA-GFP transformiert wurde. Tatsächlich konnten so im Vergleich zur Kontrollbehandlung 323 Gene identifiziert werden, welche durch AtLBD41ΔEAR:VP16 signifikant hochreguliert wurden ($SLR > 1$, $p < 0,01$), und 17 Gene, welche durch WT_AtLBD41 herunterreguliert wurden ($SLR < -1$, $p < 0,01$). Dabei wurden acht Gene durch beide Konstrukte differentiell exprimiert (Abb. 27A).

Interessanterweise zeigte ein erster visueller Vergleich aller durch AtLBD41ΔEAR:VP16 signifikant induzierten Gene, dass diese durch WT_AtLBD41 weder deutlich aktiviert noch reprimiert, bei 8 h Hypoxie tendenziell herunterreguliert und bei subsequenter Wiederbelüftung (RA) tendenziell induziert wurden (vgl. Tsai et al. 2014) (Abb. 27B). Eine detailliertere Betrachtung der acht Gene, die sowohl durch AtLBD41ΔEAR:VP16 induziert als auch durch WT_AtLBD41 reprimiert wurden, bestätigte eine Repression der Gene bei Überflutung (Hsu et al. 2013) bzw. Hypoxie (Tsai et al. 2014) (Abb. 27C). Es handelte sich bei den Genen um *ALTERNATIVE OXIDASE 1D* (*AtAOX1D*, *AT1G32350*), *LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 39* (*AtLBD39*, *AT4G37540*), *Long-chain fatty alcohol dehydrogenase family protein* (*AT4G28570*), *3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE* (*AtPGDH*, *AT1G17745*), *ARABIDOPSIS THALIANA PRODUCTION OF ATHOCYANIN PIGMENT 1* (*AtPAP1*, *AT1G56650*), *Zink-binding alcohol dehydrogenase family protein* (*AT5G42250*), *CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEP-*

TIDE 28 (*AtCYP71B28*, *AT1G13090*) und Haloacid dehalogenase-like hydrolase superfamily protein (*AT5G02230*).

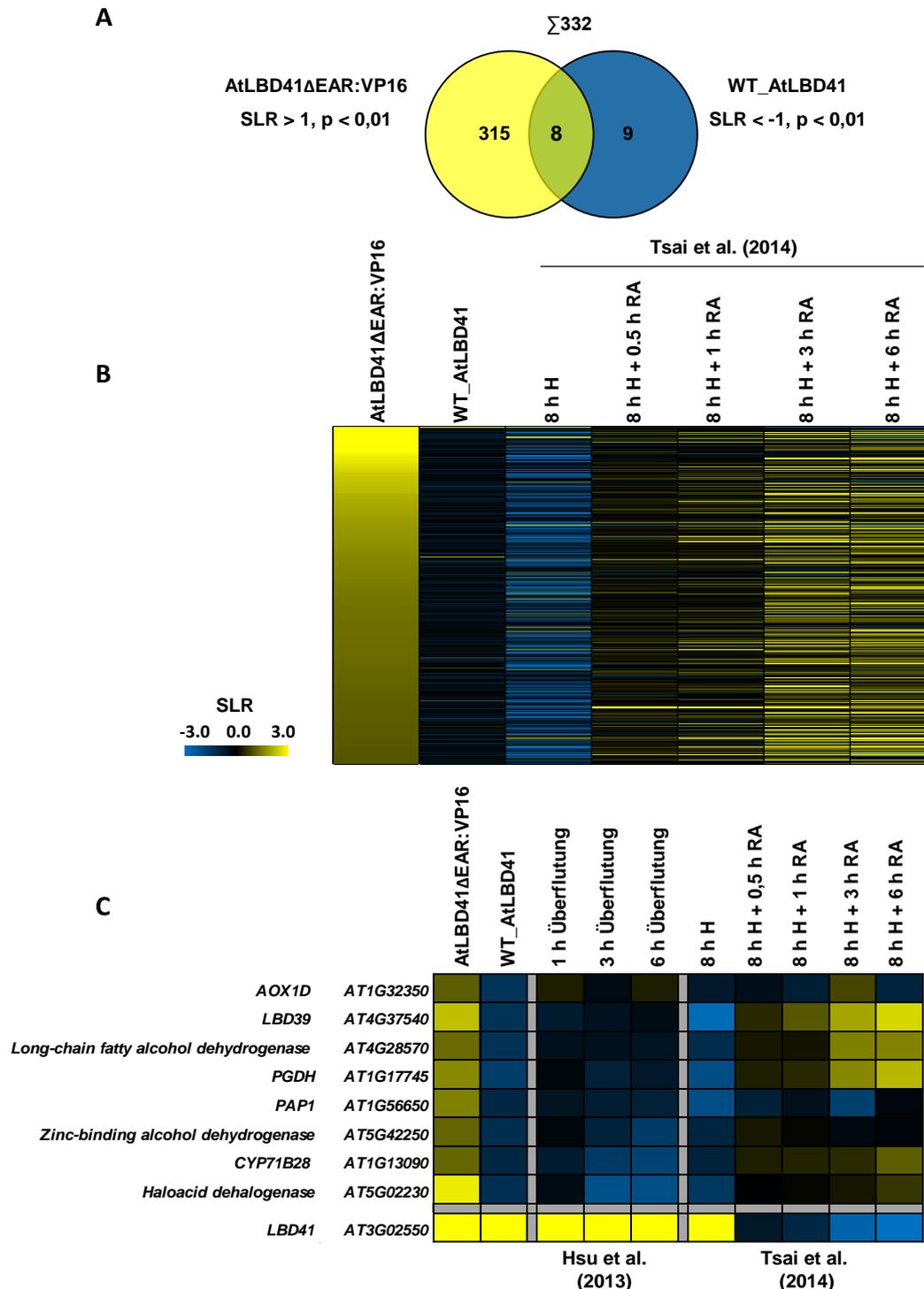


Abb. 27 | Mikroarray Analyse aus Protolasten, die WT_ATLBD41 und AtLBD41 Δ EAR:VP16 überexprimierten. (A) Venn Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEGs), die im Vergleich zur Überexpression von GFP (Kontrolle) signifikant durch AtLBD41 Δ EAR:VP16 induziert (SLR > 1, p < 0,01) oder durch WT_AtLBD41 reprimiert (SLR < -1, p < 0,01) wurden, sowie die Schnittmenge. (B) Heatmap der DEGs, die signifikant durch AtLBD41 Δ EAR:VP16 induziert (SLR > 1, p < 0,01) oder durch WT_AtLBD41 reprimiert (SLR < -1, p < 0,01) wurden, im Vergleich mit bereits publizierten Daten nach 8 h Hypoxie (H) und anschließender Wiederbelüftung (RA, 0,5 - 6 h) (Tsai et al. 2014). *Signal-Log2-Ratios* (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt. (C) Vergleich ausgewählter Gene mit bereits publizierten Datensätzen nach 1, 3 und 6 h Überflutung (Hsu et al. 2013) sowie 4 und 8 h H und anschließender RA (0,5 - 6 h) (Tsai et al. 2014).

Bei einer nachfolgenden GO-Analyse fiel auf, dass sowohl für die durch AtLBD41ΔEAR:VP16 induzierten Gene als auch für die durch WT_AtLBD41 reprimierten Gene eine signifikante Anreicherung der molekularen Funktion Oxidoreduktase-Aktivität sowie des biologischen Prozesses Oxidations- und Reduktionsprozess festgestellt werden konnte (Tab. 3). Fünf der acht Gene der Schnittmenge beider Gruppen, nämlich *AtAOX1D*, *AtPGDH2*, *AtCYP71B28*, *Zinc binding alcohol dehydrogenase family protein* und *Long-chain fatty alcohol dehydrogenase family protein*, konnten ebenfalls diesen GO-Kategorien zugeordnet werden.

Tab. 3 | Gene Ontology (GO)-Kategorien basierend auf dem AtLBD41 Mikroarray Experiment.

Analysiert wurden alle differentiell exprimierte Gene (DEGs), die durch AtLBD41ΔEAR:VP16 signifikant induziert (SLR > 1, p < 0,01) und durch WT_AtLBD41 signifikant reprimiert (SLR < - 1, p < 0,01) wurden, sowie die Schnittmenge aus beiden. Gezeigt sind ausgewählte GO-Kategorien für molekulare Funktion (MF) und biologischen Prozess (BP), *P-values* wurden mittels GOHyperGAll bestimmt.

	Ont	Match	P-value	Term
INDUZIERT AtLBD41ΔEAR:VP16 Σ323	MF	24	2,5E-03	Ionen transmembranen Transporteraktivität
	MF	164	3,2E-03	katalytische Aktivität
	MF	26	7,8E-03	substratspezifische transmembranen Transporteraktivität
	MF	28	1,2E-02	substratspezifische Transporteraktivität
	MF	13	1,7E-02	Monoxygenase-Aktivität
	MF	30	1,9E-02	transmembranen Transporteraktivität
	MF	33	2,4E-02	Transporteraktivität
	MF	37	4,3E-02	Oxidoreduktase-Aktivität
	BP	38	7,1E-05	Oxosäure metabolischer Prozess
	BP	38	7,6E-05	organische Säure metabolischer Prozess
	BP	47	4,8E-04	kleines Molekül metabolischer Prozess
	BP	18	3,2E-03	chemische Homöostase
	BP	31	3,7E-03	Carboxylsäure metabolischer Prozess
	BP	22	7,0E-03	homöostatischer Prozess
	BP	23	9,7E-03	Ionen Transmembrantransport
	BP	19	1,1E-02	organische Säure biosynthetischer Prozess
	BP	19	1,1E-02	Carboxylsäure biosynthetischer Prozess
	BP	31	1,5E-02	Regulation der biologischen Qualität
	BP	32	2,4E-02	Transmembrantransport
	BP	41	3,4E-02	Oxidations- Reduktionsprozess
BP	27	4,2E-02	Ionen transport	
BP	13	4,9E-02	Ionen Homöostase	
REPRIMIERT Σ17	MF	6	2,4E-03	Oxidoreduktase-Aktivität
	BP	6	6,2E-03	Oxidations- Reduktionsprozess
SCHNITTMENGE Σ8	MF	5	1,9E-04	Oxidoreduktase-Aktivität
	BP	5	3,0E-04	Oxidations- Reduktionsprozess

3.2.4 AtLBD41 agiert womöglich redundant mit AtLBD40 und AtLBD42

Um nun einer Funktion von AtLBD41 als Repressor der identifizierten Zielgene bei Sauerstoffmangel nachzugehen, wurde untersucht, inwieweit ein Funktionsverlust des Gens die Expression der Zielgene bei Hypoxie beeinflusst. Dazu wurde das Transkript von *AtLBD39* und *AtPGDH* mittels semiquantitativer RT-PCR nach 10 h Hypoxie im WT Col-0 und der T-DNA Linie *lbd41* (SALK_144556) analysiert (Abb. 28).

Zusätzlich wurden die Gene *PURINE PERMEASE 10* (*AtPUP10*, *AT4G18210*), *GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE 4* (*AtGGT4*, *AT1G69820*) und die zu *AtLBD41* sehr nah verwandten Gene *AtLBD40* (*AT1G67100*) und *AtLBD42* (*AT1G68510*) ausgewählt. Die vorausgegangene Mikroarray Analyse zeigte, dass *AtPUP10* signifikant durch WT_AtLBD41 reprimiert wurde, jedoch nicht signifikant durch *AtLBD41* Δ EAR:VP16 induziert wurde. *AtGGT4*, *AtLBD40* und *AtLBD42* wurden hingegen signifikant durch *AtLBD41* Δ EAR:VP16 induziert, die Überexpression von WT_AtLBD41 hatte hier keinen signifikanten Effekt (vgl. Daten A3).

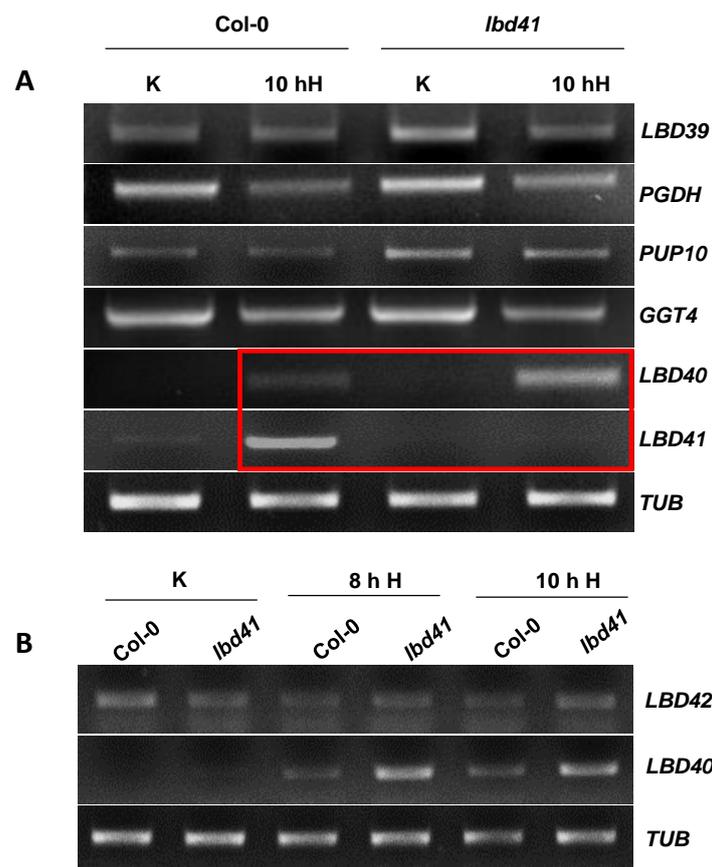


Abb. 28 | Expressionsanalyse von *AtLBD40/41/42* und putativen Zielgenen bei Hypoxie.

(A) Dargestellt ist die Expression in 7 Tage-alten Keimlingen von Col-0 und *lbd41* nach 10 h Hypoxie (H) im Vergleich zu Kontrolle (K). *TUBULIN* (*TUB*) diente als Referenzgen. Repräsentatives Ergebnis von drei semiquantitativen RT-PCR Analysen. **(B)** Analyse der Expression von *AtLBD40* (32 Zyklen) und *AtLBD42* (40 Zyklen) aus 7 Tage-alten Keimlingen von Col-0 und *lbd41* nach 8 h und 10 h Hypoxie (H) im Vergleich zu Kontrolle (K). Der Versuch wurde nur einmal durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den Daten von Tsai et al. (2014) konnte für *AtLBD39*, *AtPGDH*, *AtPUP10* und *AtGGT4* eine Herunterregulierung der Transkriptmenge nach Hypoxie beobachtet werden, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen Col-0 und *lbd41* detektiert werden (Abb. 28A). *AtLBD40* zeigte hingegen wie erwartet eine leichte Induktion bei Hypoxie (vgl. Tsai et al. 2014, Abb. 28B). Überraschenderweise war diese jedoch deutlich stärker in *lbd41* im Vergleich zu Col-0 (Abb. 28A). Folglich entstand die Hypothese, dass ein Funktionsverlust von *AtLBD41* durch *AtLBD40* kompensiert wird. Auch die Tatsache, dass *lbd41* keine offensichtlichen Phänotypen bei Kontrolle, Hypoxie (Daten nicht gezeigt) oder anderen Stressbedingungen (Luhua et al., 2013) aufwies, stützte diese Annahme.

AtLBD42 ist im Gegensatz zu *AtLBD40* und *AtLBD41* nicht Hypoxie-responsiv (Tsai et al. 2014, Abb. 28B), und auch unter anderen Bedingungen konnte in der Literatur bislang keine Expression für dieses Gen nachgewiesen werden (Shuai et al., 2002; Matsumura et al., 2009), weshalb angenommen wurde, dass es sich um ein Pseudogen handeln könnte. Im Rahmen der Arbeit konnte jedoch für *AtLBD42* durch semiquantitative RT-PCR ein Transkript detektiert werden, wenn auch nur bei einer relativ hohen Zyklenzahl (Abb. 28B). Obwohl kaum merkbare Unterschiede zwischen den Genotypen (Col-0 und *lbd41*) und Bedingungen (Kontrolle und Hypoxie) festzustellen waren, könnte auch *AtLBD42* funktionell sein und sich redundant zu *AtLBD40* und *AtLBD41* verhalten.

3.2.5 *AtLBD41* und seine homologen *AtLBD40* und *AtLBD42* können die Promotoren der Zielgene regulieren

Um weiterführend zu bestätigen, dass *AtLBD41* seine putativen Zielgene regulieren kann, wurden die Promotoren der Gene *AtLBD39*, *AtPGDH*, *AtPAP1*, *AtPUP10*, *AtGGT4* und *AtAOX1D* im Protoplastensystem getestet und C-terminal mit der codierenden Sequenz von Firefly Luciferase fusioniert. Da in diesem Versuchsaufbau eine Repression aufgrund einer niedrigen Basalaktivität der meisten Promotoren oft schwer zu detektieren ist, wurde erneut das native *AtLBD41* sowie das aktivierende *AtLBD41*ΔEAR:VP16 (C-terminaler HA-Tag) als Effektoren verwendet. Der Versuch zeigte, dass die Promotoren aller fünf Zielgene signifikant durch *AtLBD41*ΔEAR:VP16 transaktiviert wurden, nicht aber durch das wildtypische *AtLBD41* (Abb. 29A, B). Die Promotoren von *AtPAP1*, *AtPUP10* und *AtAOX1D* wiesen sogar aufgrund einer höheren Basalaktivität eine Tendenz zur Repression durch *AtLBD41* auf (Abb. 29A, B).

Zusätzlich wurde analysiert, inwieweit die Homologen *AtLBD40* und *AtLBD42* die gleichen Zielgene regulieren können (prAOX1D wurde in diesem Kontext nicht untersucht). Da für diese beiden Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine EAR-Domäne annotiert wurde (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009), wurden auch hier neben den nativen Versionen die Konstrukte *AtLBD40*ΔEAR:VP16 und *AtLBD42*ΔEAR:VP16 generiert.

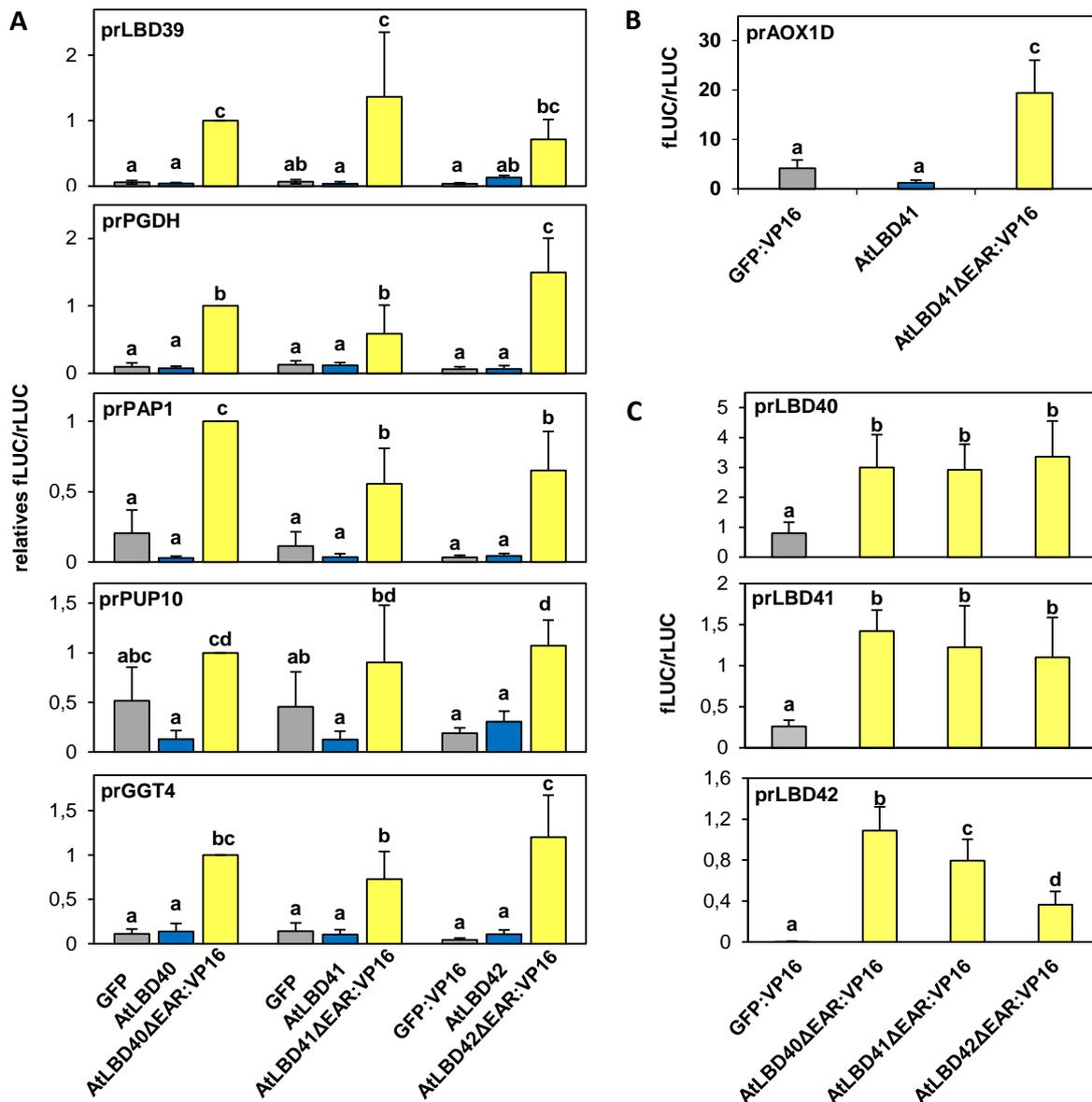


Abb. 29 | AtLBD40, AtLBD41 und AtLBD42 können die Promotoren der Zielgene regulieren.

(A) Die Luciferase (LUC) Aktivität wurde in Mesophyll-Protoplasten von Col-0 gemessen, welche transient die Effektoren AtLBD40/41/42, AtLBD40/41/42ΔEAR:VP16 und die Kontrollen GFP (im Fall von AtLBD40/41) und GFP:VP16 (im Fall von AtLBD42) exprimierten. Als Reporter wurden die Promotoren prLBD39, prPGDH, prPAP1, prPUP10 und prGGT4 und Firefly Luciferase (fLUC) fusioniert und coexprimiert. Die Promotoraktivität wurde quantifiziert, indem die fLUC Aktivität relativ zu der cotransformierten Renilla Luciferase (rLUC) als fLUC/rLUC ermittelt wurde. Die Daten wurden auf AtLBD40ΔEAR:VP16 normalisiert und sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test). **(B)** Transregulation von prAOX1D durch AtLBD41 und AtLBD41ΔEAR:VP16. Als Kontrolle diente GFP:VP16. **(C)** Transregulation von prAtLBD40/41/42 durch AtLBD40/41/42ΔEAR:VP16.

Tatsächlich konnten alle getesteten Promotoren auch durch AtLBD40ΔEAR:VP16 und AtLBD42ΔEAR:VP16 signifikant aktiviert werden, was erneut für eine Redundanz der Transkriptionsfaktoren spricht (Abb. 29A).

Zudem waren AtLBD40, AtLBD41 und AtLBD42 in der Lage, ihre eigenen Promotoren sowie die jeweils anderen Promotoren zu regulieren. Dabei zeigten AtLBD40ΔEAR:VP16, AtLBD41ΔEAR:VP16 und AtLBD42ΔEAR:VP16 eine vergleichbar starke Aktivierung von prLBD40 und prLBD41. Die Aktivierung von prLBD42 fiel durch AtLBD42ΔEAR:VP16 signifikant schwächer aus als durch seine beiden Homologen AtLBD40ΔEAR:VP16 und AtLBD41ΔEAR:VP16 (Abb. 29C).

Die restlichen der sechs Mitglieder der Klasse II LBD Genfamilie aus *A. thaliana* sind *AtLBD37*, *AtLBD38* und *AtLBD39*. Interessanterweise werden *AtLBD38* und *AtLBD39* bei Hypoxie reprimiert und bei anschließender Wiederbelüftung induziert – genau entgegengesetzt zu *AtLBD40* und *AtLBD41* (Abb. 30B). Für *AtLBD37* und *AtLBD38* wurde von Mitsuda und Ohme-Takagi (2009) ebenfalls eine EAR-Domäne annotiert, für *AtLBD39* konnte jedoch auch ein ähnliches Sequenzmotiv am C-Terminus identifiziert werden (Abb. 30A). Ein Test mit den Effektoren AtLBD37ΔEAR:VP16 und AtLBD39ΔEAR:VP16 zeigte jedoch, dass diese nicht die Promotoren der Zielgene von AtLBD41 aktivieren konnten. Lediglich AtLBD37ΔEAR:VP16 konnte prLBD39 signifikant aktivieren. Folglich lassen diese Ergebnisse die wichtige Schlussfolgerung zu, dass die identifizierten Zielgene spezifisch für AtLBD40/41/42 sind und nicht von anderen Mitgliedern der Klasse II LBDs reguliert werden.

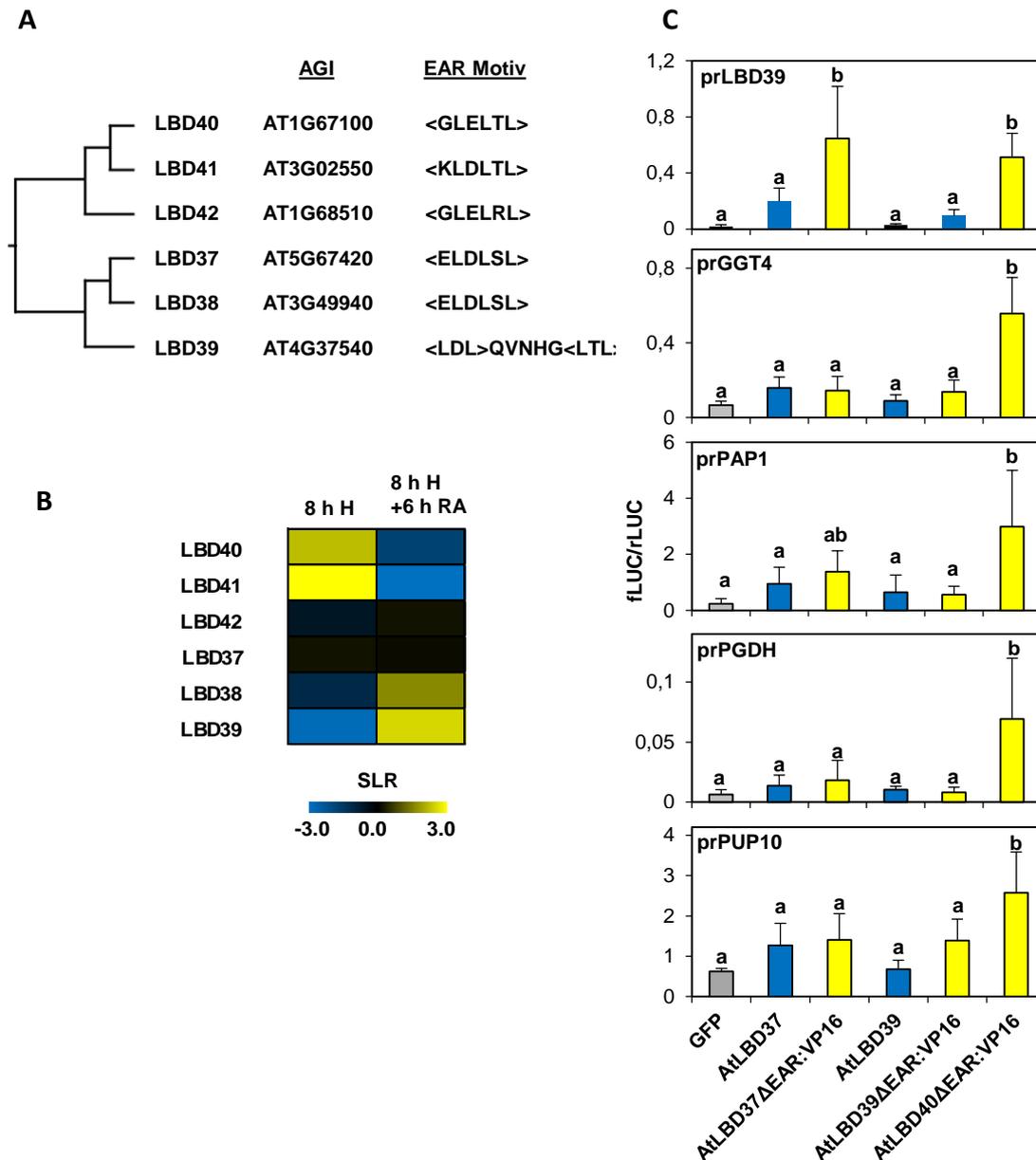


Abb. 30 | Test der Transregulation ausgewählter AtLBD41-Zielgene durch AtLBD37 und AtLBD39.

(A) Verwurzelter phylogenetischer Stammbaum der Proteinsequenzen der LBD Klasse II Mitglieder. Die EAR-Domänen wurden von Mitsuda und Ohme-Takagi (2009) annotiert. Die putative EAR-Domäne für AtLBD39 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert. (B) Heatmap der Klasse II LBDs nach 8 h Hypoxie (H) und 8 h H + 6 h Wiederbelüftung (RA) (Tsai et al. 2014). *Signal-Log₂-Ratios* (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt. (C) Die Luciferase (LUC) Aktivität wurde in Mesophyll-Protoplasten von Col-0 gemessen, welche transient die Effektoren GFP (Kontrolle), AtLBD37/39 oder AtLBD37/39ΔEAR:VP16 in Kombination mit entsprechenden Promotoren (prLBD39, prPGDH, prPAP1, prPUP10 und prGGT4) exprimierten, welche an die codierende Sequenz der Firefly Luciferase (fLUC) fusioniert wurden. AtLBD40ΔEAR:VP16 diente hierbei als Positivkontrolle. Die Promotoraktivität wurde quantifiziert, indem die fLUC Aktivität relativ zu der cotransformierten Renilla Luciferase (rLUC) als fLUC/rLUC ermittelt wurde. Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

3.2.6 LBD41 aus *Oryza sativa*

LBD41 wird bei Hypoxie und Überflutung nicht nur in Brassicaceae wie *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* und *Capsella rubella* induziert (Gasch et al., 2016), sondern auch in anderen Arten wie Reis (Locke et al., 2017) und Mais (Campbell et al., 2015). Daher stellte sich die Frage, inwieweit die transregulatorischen Mechanismen dieses Gens zwischen den Spezies konserviert vorliegen. Während in *A. thaliana* die drei Gene *AtLBD40*, *AtLBD41* und *AtLBD42* einem gemeinsamen Vorfahren zugeordnet werden konnten, stammen in dem monokotyledonen Reis lediglich zwei Gene, *OsLBD40* (*LOC_Os01g32770*) und *OsLBD41* (*LOC_Os01g03890*), von einem gemeinsamen Vorfahren ab (Kong et al., 2017).

Die Sequenz von *OsLBD41* konnte aus *Oryza sativa* isoliert werden, wobei erneut zwei Versionen kloniert wurden – WT_*OsLBD41* und *OsLBD41*Δ*EAR*:VP16. Auch für die möglichen *AtLBD41*-Zielgene *AtGGT4*, *AtPUP10* und *AtPGDH* wurden putativ orthologe Gene in *O. sativa* identifiziert und für weitere Analysen ausgewählt: *OsGGT4* (*LOC_Os04g38450*), *OsPUP1.1* (*LOC_Os04g49757*), *OsPUP3.1* (*LOC_Os03g08880*), *OsPUP3.2* (*LOC_Os09g29239*) und *OsPGDH* (*LOC_Os08g34720*). Während die Expression der Zielgene bei Sauerstoffmangel in *A. thaliana* deutlich reprimiert wird (Tsai et al. 2014), ist bei Überflutung in Reis keine klare Repression zu verzeichnen (Locke et al., 2017) (Abb. 31).

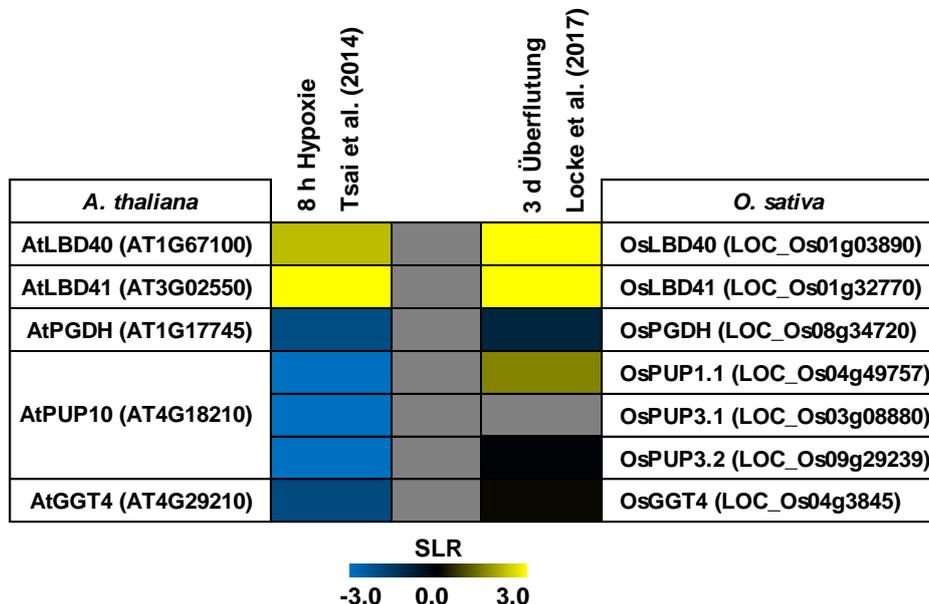


Abb. 31 | Vergleich der Genexpression von *AtLBD40/41* und deren Zielgene mit möglichen orthologen Genen aus Reis. Dargestellt ist die Expression ausgewählter Gene aus *A. thaliana* nach 8 h Hypoxie (Microarray, Tsai et al. 2014) sowie aus Reis nach 3 d Überflutung im Gewächshaus bei normalem Tag/Nacht Rhythmus (RNA-Seq, Locke et al. 2017). *Signal-Log2-Ratios* (SLRs) werden durch die Intensität der Farbskala von -3 (blau) bis 3 (gelb) angezeigt.

Die Analyse der Transaktivierungseigenschaften wurde erneut im Protoplastensystem mit Protoplasten aus Arabidopsis Col-0 durchgeführt. Interessanterweise konnten auch hier die bereits im Vorfeld getesteten Arabidopsis Effektoren AtLBD40ΔEAR:VP16 und AtLBD41ΔEAR:VP16 die Reis-Promotoren der Gene *OsPGDH*, *OSPUP1.1*, *OSPUP3.1* und *OsGGT4* signifikant aktivieren (Abb. 32A). Die Ausnahme bildete der Promotor von *OSPUP3.2*, bei welchem nur AtLBD41ΔEAR:VP16 eine Tendenz zur Aktivierung aufwies.

Anschließend wurde getestet, inwiefern der Reis-Effektor OsLBD41ΔEAR:VP16 die Zielgene aus Reis aktivieren konnte. Im Gegensatz zu den Effektoren aus *A. thaliana* konnte lediglich der Promotor von *OsGGT4* signifikant aktiviert werden, wenngleich der Effekt im Vergleich zu den Effektoren aus Arabidopsis deutlich schwächer ausfiel (Abb. 32B). Dennoch lassen die Ergebnisse eine hohe interspezifische Konservierung der Signaltransduktion bei Sauerstoffmangel durch den Transkriptionsfaktor LBD41 vermuten.

Da die Versuche an dieser Stelle nicht weitergeführt wurden, gibt es noch Raum für Optimierungen. Für die Durchführung wurden Protoplasten, die aus Arabidopsis gewonnen wurden, verwendet. Im nächsten Schritt müssten Protoplasten aus Reis isoliert und die Versuche wiederholt werden, da gewisse Faktoren aus Reis in Arabidopsis nicht vorhanden sein könnten. Auch das sehr nah verwandte Gen *OsLBD40* sollte dann in die Versuche inkludiert werden. Davon abgesehen wäre es natürlich denkbar, dass noch nicht die richtigen orthologen Zielgene in Reis identifiziert wurden, zumal die hier untersuchten keine Repression bei Sauerstoffmangel aufweisen (Abb. 31).

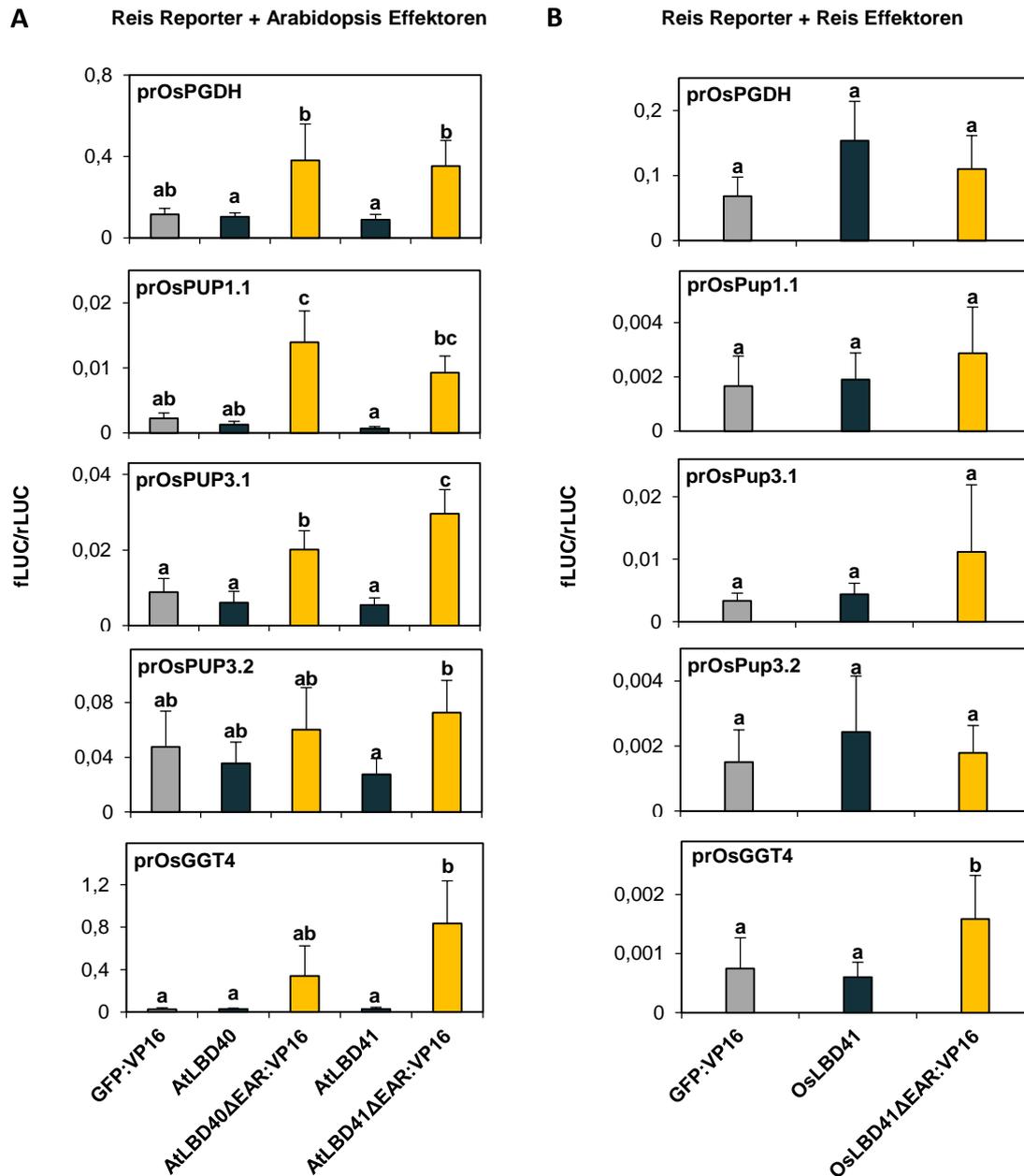


Abb. 32 | Test der Transregulation putativer LBD41-Zielgene in Reis durch Effektoren aus Arabidopsis und Reis. (A) Die Luciferase (LUC) Aktivität wurde in Mesophyll-Protoplasten von Col-0 gemessen, welche transient die Effektoren GFP:VP16 (Kontrolle), AtLBD40/41 oder AtLBD40/41ΔEAR:VP16 in Kombination mit entsprechenden Promotoren aus *O. sativa* (prOsPGDH, prOsPUP1.1, prOsPUP3.1, prOsPUP3.2 und prOsGGT4) exprimierten, welche an die codierende Sequenz der Firefly Luciferase (fLUC) fusioniert wurden. Die Promotoraktivität wurde quantifiziert, indem die fLUC-Aktivität relativ zu der cotransformierten Renilla Luciferase (rLUC) als fLUC/rLUC ermittelt wurde. Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test). (B) Test mit den Effektoren OsLBD41 und OsLBD41ΔEAR:VP16 aus Reis, GFP:VP16 diente ebenfalls als Kontrolle.

3.2.7 Generierung und Analyse einer *lbd40/41/42* Dreifachmutante

Da durch den Funktionsverlust des Gens *AtLBD41* bislang keine Phänotypen detektiert werden konnten - womöglich aufgrund einer Kompensation durch die Transkriptionsfaktoren *AtLBD40* und *AtLBD41* - war es das Ziel, die Dreifachmutante *lbd40/41/42* zu generieren.

Im Gegensatz zu *AtLBD41* standen für *AtLBD40* und *AtLBD42* keine passenden T-DNA Insertionslinien zur Verfügung. Daher wurde das CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)/CRISPR-associated (Cas) System verwendet, welches sich in den letzten Jahren als wertvolles Werkzeug zur gezielten Genomeditierung in Pflanzen erwiesen hat (Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013; Chen et al., 2019).

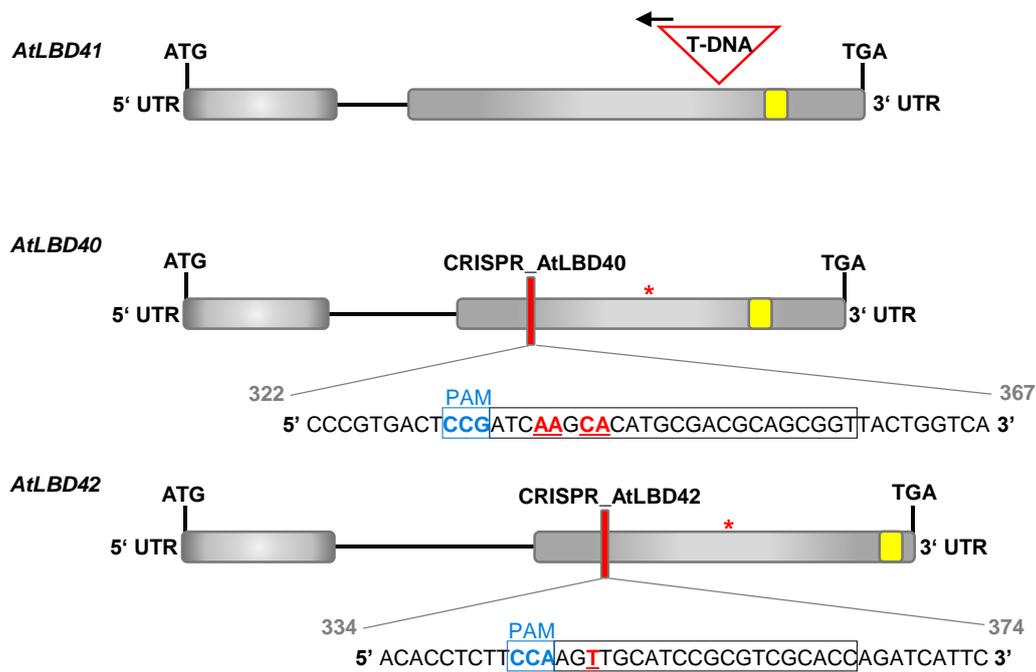


Abb. 33 | Genstruktur und Mutationsstellen von *AtLBD40*, *AtLBD41* und *AtLBD42* zur Generierung einer Dreifachmutante.

Die T-DNA Insertion von *lbd41* (SALK_144556) befindet sich im zweiten Exon. Der Pfeil zeigt die Richtung der T-DNA Insertion von rechten T-DNA zum linken T-DNA Rand. Die Mutationen von *AtLBD40* und *AtLBD42* wurden durch CRISPR/Cas9 hervorgerufen und befinden sich im zweiten Exon. Die ausgewählten Zielsequenzen der *guide* RNAs sind durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet, die der PAM- (*protospacer adjacent motif*) Sequenz durch einen blauen Rahmen. Rote Buchstaben kennzeichnen die durch CRISPR/Cas9 induzierte Mutation, das rote Sternchen zeigt ein verfrühtes Stopcodon. Vorhergesagte EAR-Domänen (Mitsuda und Ohme-Takagi, 2009) sind durch gelbe Kästen dargestellt. Schematazeichnungen, nicht maßstabsgetreu.

Zu diesem Zweck wurden sogenannte *guide* RNAs entworfen, die die assoziierte Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* sowohl für *AtLBD40* als auch für *AtLBD42* zu einer Zielsequenz am Anfang des zweiten Exons, in direkter Nähe zu einem *protospacer adjacent motif* (PAM) 5'-NGG-3', lenkten. Die Cas9 Nuklease führt dann einen Doppelstrangbruch ein, der durch das sogenannte *non-homologous end joining* repariert werden kann (Symington & Gautier, 2011). Da dieser Reparaturmechanismus fehlerbehaftet ist, wurden bei *lbd40* vier zusätzliche Basenpaare im zweiten Exon inseriert, bei *lbd42* ein Basenpaar im zweiten Exon (Abb. 33). In beiden Fällen führten die Insertionen aufgrund einer Änderung des Leserahmens zu einem verfrühten Stopp-Codon und damit zu einem stark verkürzten und nicht funktionellen Protein.

Mit Hilfe dieser Linien wurde die Dreifachmutante *lbd40/41/42* im Arabidopsis Col-0 Hintergrund erstellt. Im Detail wurde dabei so vorgegangen, dass zunächst die T-DNA Linie *lbd41* mit einer durch CRISPR/Cas9 erzeugten homozygoten *lbd40* Einzelmutante gekreuzt wurde. Die homozygote *lbd40/41* Doppelmutante wurde dann mit dem CRISPR/Cas9-Konstrukt für *AtLBD42* mittels *floral dip* transformiert und eine homozygote *lbd40/41/42* Dreifachmutante in der T2 Generation identifiziert. Um die Selektion der Linien zu vereinfachen, wurden die Zielsequenzen der *guide* RNAs in der Regel so gewählt, dass im Falle einer erfolgreich eingeführten Mutation eine Restriktionsschnittstelle zerstört wurde. Zudem wurde darauf selektiert, dass die Linien die Cas9-Nuklease und das damit verbundene Resistenzmarker gen verloren hatten, um eine Mutation von unspezifischen Zielgenen, sogenannten *off-targets*, zu vermeiden (Chen et al., 2019).

Eine anschließende Analyse der Genexpression der Zielgene *AtPUP10* und *AtLBD39* zeigte jedoch auch in der Dreifachmutante *lbd40/41/42* keine veränderte Expression im Vergleich zum WT, und die Transkripte der beiden putativen Zielgene wurden gleichermaßen in Col-0 und *lbd40/41/42* bei Hypoxie reprimiert (Abb. 34). Jedoch handelt es sich hierbei nur um ein biologisches Replikat, zudem wurden an dieser Stelle nur zwei der putativen Zielgene untersucht.

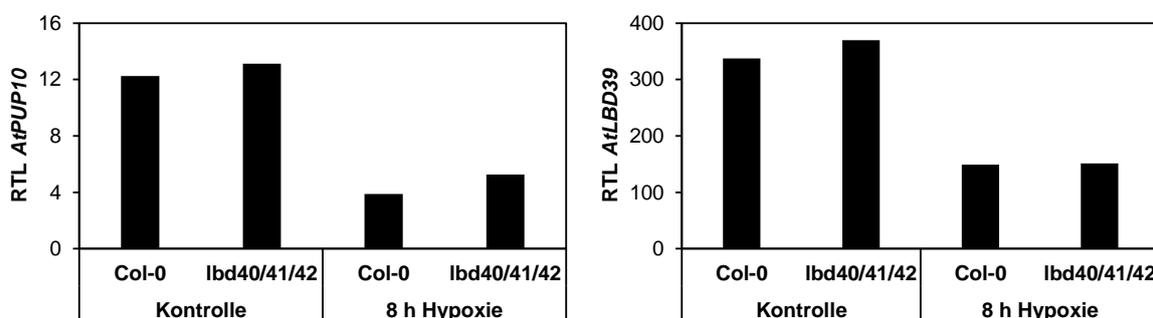


Abb. 34 | Die Mutante *lbd40/41/42* weist keine veränderte Expression putativer Zielgene bei Hypoxie auf.

7 Tage alte Keimlinge von Col-0 und *lbd40/41/42* wurden für 8 h mit Hypoxie (H) behandelt. Kontrollen (K) wurden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Relative Transkriptlevel (RTL) wurden mittels RT-qPCR analysiert und auf die Referenzgene *Elongationsfaktor 1-alpha (EF1A)* und *SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A)* normalisiert. Dargestellt ist ein biologisches Replikat, das sich aus drei technischen Replikaten zusammensetzt.

Darüber hinaus wurden Überlebensexperimente bei Sauerstoffmangel mit der Dreifachmutante durchgeführt. Zunächst wurde die Überflutungstoleranz untersucht und Pflanzen von Col-0 und *lbd40/41/42* im 10-Blattstadium für 7, 8, 9 und 10 Tage in Dunkelheit überflutet, während Kontrollpflanzen für die gleiche Dauer in Dunkelheit an der Luft inkubiert wurden (Abb. 35A). Nach drei Wochen Erholungszeit unter dem normalen Kurztag-Rhythmus wurde die Überlebensrate, welche als Fähigkeit zur Bildung neuer Blätter definiert wurde, bestimmt. Pflanzen der *lbd40/41/42* Mutante zeigten keine veränderte Überlebensrate im Vergleich zu Col-0. Nach 10 Tagen überlebten noch ca. 70% der Pflanzen, 30 % waren tot (Abb. 35A).

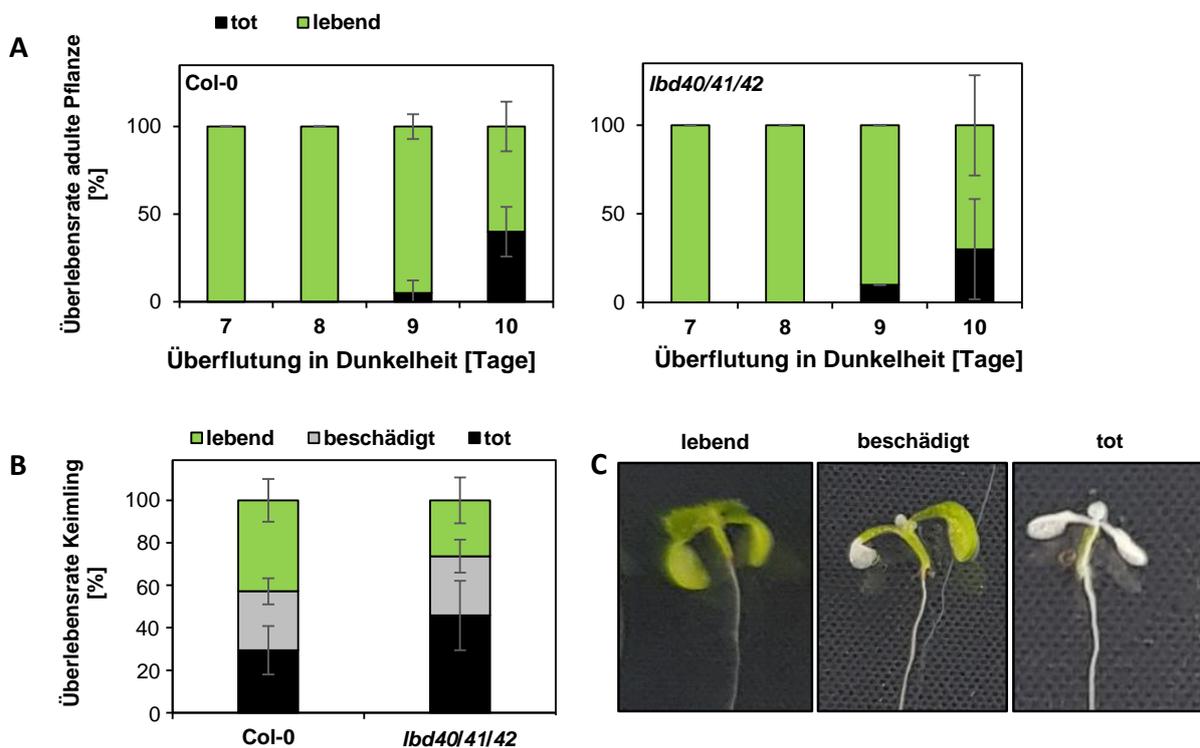


Abb. 35 | Überlebensexperimente bei Sauerstoffmangel mit der Dreifachmutante *lbd40/41/42*.

(A) Pflanzen des WT Col-0 und der Trippelmutante *lbd40/41/42* wurden im 10-Blattstadium für 7, 8, 9 und 10 Tage in Dunkelheit überflutet. Nach drei Wochen der Erholungsphase unter normalen Kurztagbedingungen wurde die Überlebensrate bestimmt. Diese wurde als die Fähigkeit, neue Blätter auszubilden, definiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 2 Replikaten ($n > 8$). **(B)** 7 Tage-alte Keimlinge von Col-0 und *lbd40/41/42* wurden für 16 h der Anoxie (0 % Sauerstoff) in Dunkelheit ausgesetzt, Kontrollen wurden für die gleiche Dauer in Dunkelheit an der Luft inkubiert. Eine darauffolgende Wiederbelüftung wurde für 7 Tage unter normalen Langtagbedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Keimlinge den Kategorien „lebend“ (Bildung neuer Blätter, grün), „beschädigt“ (teilweise Chlorose der Blätter, grau) und „tot“ (vollständige Chlorose der Blätter, schwarz) zugeordnet. Dargestellt ist die Überlebensrate in Prozent. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 biologischen Replikaten ($n > 100$) (Daten von Jay Jethva). **(C)** Repräsentative Beispielfotografien von Keimlingen, die den Kategorien „lebend“, „beschädigt“ oder „tot“ zugeordnet wurden (siehe B).

Zudem wurde untersucht, welchen Effekt ein Sauerstoffmangel im Keimlingsstadium hervorruft. Die Überlebensexperimente wurden von Jay Jethva am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen des Botanischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Dazu wurden 7 Tage-alte Keimlinge von Col-0 und *lbd40/41/42* auf MS-Agarplatten für 16 h kontrolliert der Anoxie (0 % O₂, Dunkelheit) ausgesetzt, während Kontrollen in Dunkelheit an der Luft inkubiert wurden. Zur Regeneration wurden die Keimlinge für weitere 7 Tage unter normalen Kurztag-Bedingungen inkubiert. Anschließend konnte die Überlebensrate bestimmt werden. Keimlinge, die in der Lage waren, neue Blätter auszubilden, wurden als „lebend“ eingestuft, während Keimlinge mit kompletter Blatt-Chlorose als „tot“ eingestuft wurden. Keimlinge, die nur eine teilweise Chlorose der Blätter aufwiesen, wurden der Kategorie „beschädigt“ zugeordnet (Abb. 35B, C).

Interessanterweise zeigte der Versuch erstmals einen Phänotyp für *lbd40/41/42*. Während bei Col-0 etwa 30 % der Keimlinge nach Anoxie tot waren, so waren dies bei *lbd40/41/42* bereits etwa 45 % (Abb. 35B). In Übereinstimmung konnten bei Col-0 nur 26 % der Keimlinge als lebend eingestuft werden, bei *lbd40/41/42* hingegen 43 %. Bei beiden Linien war ein ähnlich gleicher Teil an Keimlingen von 28 % beschädigt.

Folglich zeigen diese Ergebnisse, dass *AtLBD40/41/42* zur Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel beitragen und ein Funktionsverlust dieser drei TFs in einer verminderten Überlebensrate im Keimlingsstadium resultiert. Dennoch konnte bislang keine veränderte Regulation der Zielgene in *lbd40/41/42* detektiert werden. Für weiterführende Versuche müssten noch weitere der putativen Zielgene analysiert werden. Dafür wäre eine genomweite Expressionsanalyse mittels Mikroarray oder RNA-Seq sinnvoll.

3.2.8 Analyse von stabilen *LBD41*-Überexpressionslinien

Zur Charakterisierung des Transkriptionsfaktors *AtLBD41* mit dem Ziel, spätere Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)-Seq oder RNA-Seq Analysen durchzuführen, wurden zudem stabile *LBD41*-OE Linien mit einem N-terminalen HA- und einem C-terminalen GFP-Epitop (p35S:HA-LBD41-GFP) im Arabidopsis Col-0 Hintergrund generiert. Eine Überexpression von *AtLBD41* sollte demnach eine Situation simulieren, in welcher putative Zielgene der Hypothese nach konstitutiv reprimiert werden.

Eine erfolgreiche Überexpression konnte durch Western-Blot Analyse für mehrere unabhängige Linien bestätigt werden, indem eine starke Bande unterhalb von 70 kDa detektiert werden konnte (Abb. 36A). Diese war leicht größer als erwartet, da eine Fusion von *AtLBD41* (28,4 kDa) mit GFP (28,3 kDa) und 3xHA (5,6 kDa) in einem Molekulargewicht von 62,3 kDa resultiert. Zudem konnten abhängig von der Signalstärke zwei schwache Banden bei ca. 30 kDa und 50 kDa detektiert werden, bei welchen es sich womöglich um Abspaltungsprodukte handelte (Abb. 36A). Für weitere Analysen wurden die Linien mit den relativ starken Signalen *LBD41*-OEI und *LBD41*-OElI ausgewählt. Für beide Linien konnte aufgrund

der C-terminalen Fusion mit einem GFP-Tag eine klare Lokalisation von *AtLBD41* im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 36B). Durch RT-qPCR konnte für *LBD41*-OEI und *LBD41*-OEII ein signifikant höheres *AtLBD41*-Transkriptlevel im Vergleich zum WT Col-0 detektiert werden, wobei das Transkript im Fall von *LBD41*-OEI ca. 700-fach erhöht und für *LBD41*-OEII ca. 1300-fach erhöht war (Abb. 36C).

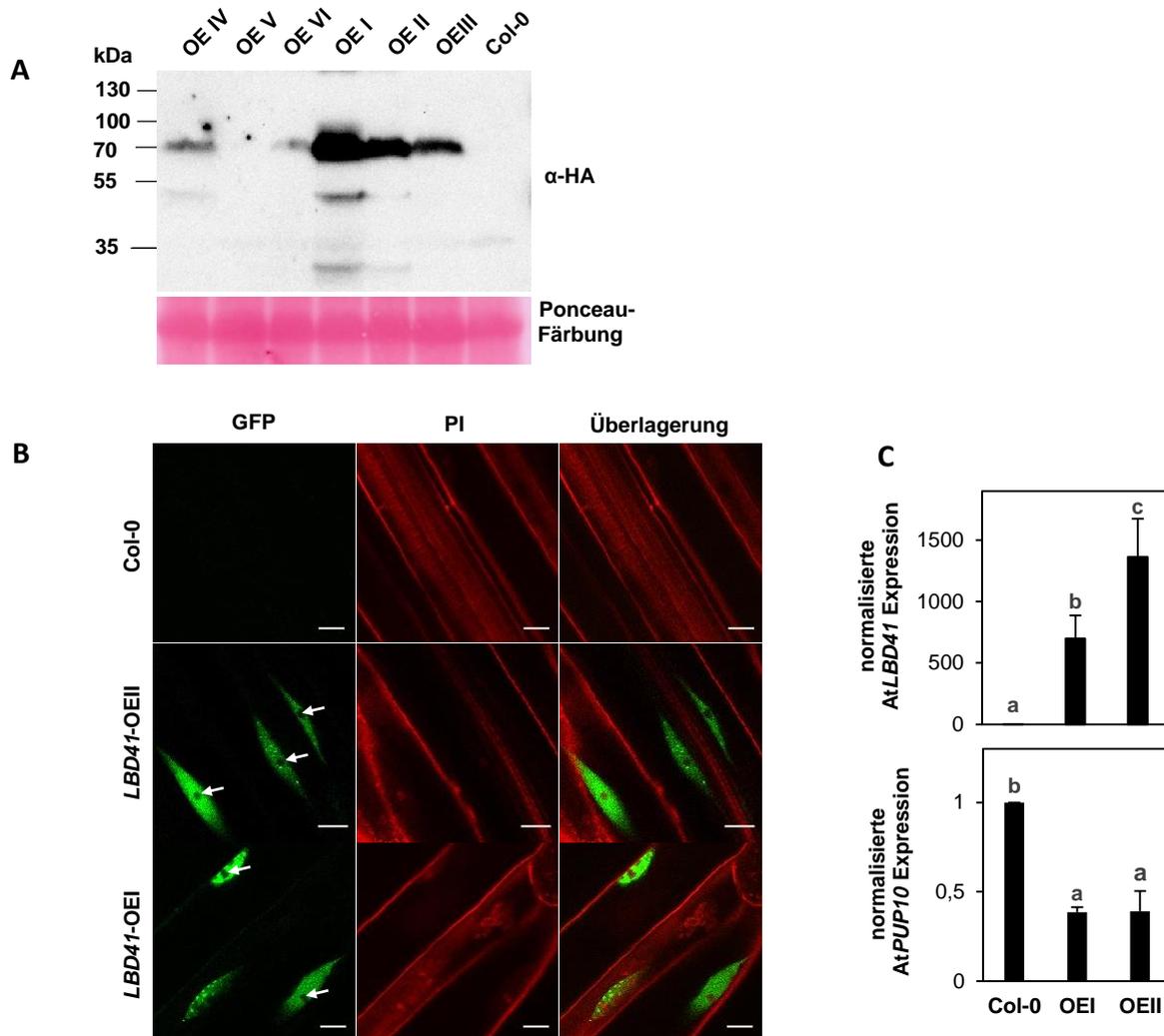


Abb. 36 | Analyse von *LBD41*-Überexpressionslinien.

(A) Western Blot mit Proteinextrakten aus stabilen unabhängigen Arabidopsis *LBD41*-OE Linien (p35S:HA-*LBD41*-GFP). Ponceau-Färbung als Ladekontrolle. Das Molekulargewicht für ^{35}S :AtERF#111^{GFP} liegt bei 62,3 kDa. **(B)** Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie Visualisierung von Arabidopsis *LBD41*-OEI und *LBD41* OE-II Linien, die p35S:HA-*LBD41*-GFP stabil exprimierten. Die Bilder zeigen Chlorophyll- und GFP-Fluoreszenz sowie die Überlagerung beider und wurden von Wurzeln der transgenen Arabidopsis-Pflanzen aufgenommen. Weiße Pfeile zeigen den Nukleolus. PI = Propidium Iodid Färbung; Maßstab: 10 μm . **(C)** RT-qPCR Analyse der RTL von *AtLBD41* und *AtPUP10* in 7 Tage-alten Keimlingen von *LBD41*-OEI und *LBD41*-OEII. Relative Transkriptlevel wurden relativ zu den Referenzgenen *Elongationsfaktor 1-alpha* (*EF1A*) und *SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A* (*PP2A*) analysiert und auf die Kontrolle Col-0 normalisiert. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Werte, die sich mit $p < 0,05$ signifikant voneinander unterscheiden (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD Test).

Interessanterweise zeigte die Transkriptanalyse des putativen Zielgens *AtPUP10*, dass dessen Transkriptmenge ca. um die Hälfte niedriger war als in Col-0. Dieses Ergebnis deutet erneut darauf hin, dass *AtPUP10* tatsächlich durch den Transkriptionsfaktor AtLBD41 reguliert wird und bestätigt zudem, dass es sich um funktionelle Überexpressionslinien handelt, welche für weitere Experimente in der Zukunft herangezogen werden können.

Zusätzlich wurde der Ansatz verfolgt, stabile Überexpressionslinien des aktivierenden Konstrukts AtLBD41ΔEAR:VP16 zu generieren (p35S:AtLBD41ΔEAR:VP16-HA). In der Theorie sollten hier potentielle Zielgene, die bei Sauerstoffmangel normalerweise reprimiert werden, konstitutiv aktiviert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es bislang gelungen, homozygote Linien mit einer erhöhten Transkriptmenge zu selektieren (Daten nicht gezeigt), die jedoch noch weiterer Charakterisierung bezüglich Proteinmenge und Regulation der Zielgene bedürfen.

3.2.9 AtLBD41 wird posttranslational durch SUMOylierung modifiziert

Eine dynamische Regulation der Genexpression wird oft durch posttranslationale Modifikationen von Transkriptionsfaktoren hervorgerufen. Für AtLBD41 konnte im Rahmen einer Proteom-weiten Analyse von SUMO-Substraten eine Interaktion mit den SUMO-modifizierenden Enzymen SCE1 sowie ESD4 gezeigt werden, welche zur Konjugation und Dekonjugation von SUMO führen (Elrouby & Coupland, 2010).

Nun stellte sich die Frage, ob eine SUMOylierung von AtLBD41 auch *in vivo* nachgewiesen werden kann. Mögliche SUMO-Bindestellen befinden sich in der Regel in dem Konsensusmotiv Ψ -K-x-D/E, wobei Ψ eine hydrophobe Aminosäure darstellt, K das Lysin ist, an welches SUMO bindet und D/E entweder Aspartat oder Glutamat sind (Bernier-Villamor et al., 2002; Dohmen, 2004; Park et al., 2011). Mit Hilfe des Tools GPS-SUMO (Zhao et al., 2014) sowie durch eine neue Vorhersagemethode aus dem

A

LOC_Os01g03890.1	VRPAIFRSLLYEACGRMLNPVYGSVGLLWSGNWQLCQSAVESVLRGMPIAQPPSAT---	117
AtLBD42	LRPAIFRSLLYEACGRIVNPVDGSGVGLMWSGNWAQCQAAVDAVLNGLPIHTHTPLPSASAS	120
LOC_Os01g32770.1	LRPAVFRSLLYEACGRIVNPIYGSVGLLWSGQWQACQAAVEA VLKGD PVVQVSSEAAAAA	120
AtLBD40	LRPAIFRSLLYEACGRIVNPIYGSVGLLWSGNWHLCAAVEAVMRGSPVTPACDAAVTG	120
AtLBD41	LRPGIFRSLLEACGRIVNPIYGSVGLLWSGNWQLCQDAVEA VMKGE PVKEIATDAATIG	120
	:**.:*****:*****:**: *****:***:* ** **::*: * *: ::	

B

LOC_Os01g03890.1	----GHSN-----DTADTVDGSHVSQSEPEPRAT-SAADEVHDAG LDLTLG	262
AtLBD42	TLENVESRREAPFNQSSPNLG-----FDDQVDINEVG LELRLG	233
LOC_Os01g32770.1	HVDDGDNDMAIADVTPPRAGSEDEVETGSHVSQAEQSPVVEHEEGEEVEVG LELTLG	291
AtLBD40	-----TTE EPKTI W GLELTLG	192
AtLBD41	--KESESNVSEVLAFSP-----PAVKGS GEIKLDLTLR	227
	*: * *	

Abb. 37 | Identifikation möglicher SUMOylierungsstellen von LBD40/41.

Ausschnitte eines Alignments der Proteinsequenz ausgewählter Arabidopsis und Reis LBDs. Putative SUMOylierungsstellen in der DNA-Bindedomänenregion (A) und in der Nähe der EAR-Domäne (B) sind gelb hinterlegt, die EAR-Domäne ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet.

Labor von Prof. Sadanandom (unpubliziert) konnten mehrere mögliche SUMOylierungsstellen in der Sequenz von AtLBD41 identifiziert werden (Abb. 37).

Interessanterweise lag dabei ein Motiv in der DNA-Bindedomäne von AtLBD41 vor und war auch in dem Reis-Orthologen OsLBD41 zu identifizieren (Abb. 37A). In AtLBD40 und OsLBD40 war dieses Motiv jedoch nicht konserviert, da die Aminosäuresequenz an Stelle des zur Bindung von SUMO essentiellen Lysins (K105) ein Arginin aufwies. Weitere potentielle SUMOylierungsstellen konnten in der Nähe der jeweiligen EAR-Domänen von AtLBD40 und AtLBD41 identifiziert werden, nicht jedoch in den orthologen Genen aus Reis (Abb. 37B). Für AtLBD42 konnte lediglich ein putatives SUMO-Motiv, jedoch in einem anderen Sequenzabschnitt, detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu analysieren, ob AtLBD41 nun tatsächlich *in planta* mit SUMO interagiert, wurde eine Co-Immuno-präzipitation (Co-IP) durchgeführt (Abb. 38, Daten von Lukas Stahl). Dazu wurde AtSUMO1 N-terminal mit einem HA-Epitop und AtLBD41 C-terminal mit einem GFP-Epitop fusioniert und transient mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in *N. benthamiana* exprimiert. Zum Nachweis der Interaktion wurde AtLBD41-GFP mittels anti-GFP Antikörper, welche an Sepharose G Beads gekoppelt wurden, isoliert und die co-immunopräzipitierten Proteine mittels GFP- und HA-Antikörper detektiert. Im α -GFP Immunoblot konnte zunächst eine schwache Bande zwischen 55 kDa und 70 kDa für das unmodifizierte AtLBD41-GFP detektiert werden, eine Bande <25 kDa, welche womöglich einen abgespaltenen GFP-Tag darstellte sowie multiple Banden bei ca. 250 kDa, welche wahrscheinlich das mit SUMO posttranslational modifizierte AtLBD41-GFP widerspiegeln (Abb. 38). Generell ist anzumerken, dass dieses Signal bei 250 kDa auch ohne die Coexpression von HA-AtSUMO1 bei AtLBD41-GFP im GFP Immunoblot zu verzeichnen war, was bedeutet, dass SUMO-Proteine aus *N. benthamiana* ebenfalls zur SUMOylierung von SUMO-Substraten aus Arabidopsis führen könnten (Abb. 38). Dennoch konnte im α -HA Immunopräzipitat auf dieser Höhe (>250 kDa) ein Signal für HA-AtSUMO1 detektiert werden, wobei in den Kontrollen, in welchen AtLBD41-GFP ohne AtSUMO1 bzw. nur GFP mit AtSUMO1 exprimiert wurde, erwartungsgemäß kein Signal zu verzeichnen war. Folglich scheint AtLBD41 tatsächlich SUMOyliert zu werden (Abb. 38).

Durch zielgerichtete Mutagenese wurde zudem AtLBD41(K105R) (mit C-terminalen GFP-Tag) kloniert, bei welchem das für die SUMOylierung essentielle Lysin (K105) nahe der DNA-Bindedomäne zu einem Arginin (R105) mutiert wurde und ebenfalls im Rahmen einer Co-IP mit HA-AtSUMO1 analysiert (Abb. 38). Frühere Studien hatten gezeigt, dass eine Mutation von K zu R die SUMOylierung blockiert (Colby et al., 2006; Sarge, 2016; Gostissa et al., 1999). Bereits im α GFP Immunoblot war nur ein sehr schwaches Signal für AtLBD41(K105R)-GFP zu detektieren (Abb. 38). Dies könnte darauf hindeuten, dass die SUMOylierung an dieser Stelle in der DNA-Bindedomäne von AtLBD41 einen großen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat, welche durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure drastisch

abnimmt. Demnach konnte hier kein Signal für HA-AtSUMO1 mittels α HA detektiert werden, was die Wichtigkeit dieser SUMOylierungsstelle impliziert.

Im Falle des sehr nah verwandten AtLBD40-GFP, welches an ebendiesem Motiv ein natürliches Arginin an Stelle von Lysin aufwies, konnte ebenfalls nur ein sehr schwaches Signal mittels α GFP detektiert werden (Abb. 38). Dennoch war auch im α HA-Immunoblot noch ein leichtes Signal für HA-AtSUMO1 nachzuweisen, was darauf hindeutet, dass auch AtLBD40 SUMOyliert werden könnte.

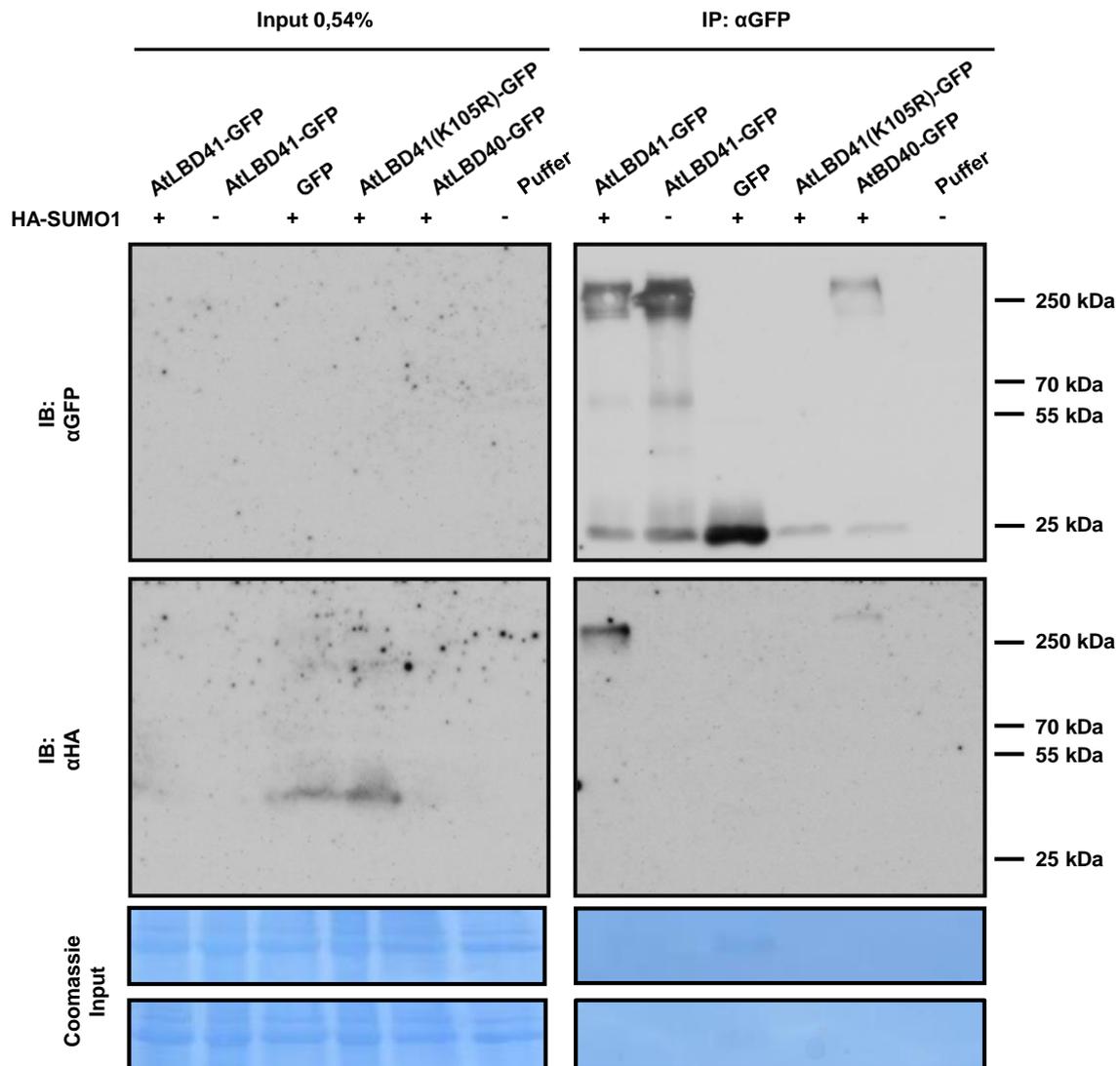


Abb. 38 | SUMOylierung von AtLBD41 im transienten Tabak-System.

HA-AtSUMO1 und *AtLBD41-GFP* wurden unter Kontrolle eines 35S-Promotors in Tabakblättern co-exprimiert. Zum Nachweis der Interaktion wurde AtLBD41 zunächst immunopräzipitiert (anti-GFP Sepharose G Beads). Anschließend folgte eine SDS-PAGE. Zur Detektion der Proteine nach Immunoblot wurde der primäre Antikörper anti-GFP (α GFP) in Kombination mit dem sekundären Antikörper anti-Maus verwendet, bzw. anti-HA (α GFP) in Kombination mit anti-Maus zur Detektion von HA-AtSUMO1. Es wurde die gleiche Menge an immunopräzipitierten Protein für beide Immunoblots verwendet, die Input Fraktionen zeigen jeweils 0,54 % des Proteinextrakts. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung wurde zur Ladekontrolle durchgeführt. Das erwartete Molekulargewicht von AtLBD41-GFP liegt bei ~ 60 kDa. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme von 3 biologisch unabhängigen Replikaten, die Experimente wurden von Lukas Stahl durchgeführt.

4 Diskussion

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise werden Pflanzen während ihres Lebenszyklus‘ immer wieder mit einer großen Anzahl an Stresssituationen konfrontiert. Diese können entweder abiotischer (zum Beispiel zu viel oder zu wenig Wasser, Salz, Kälte, Hitze) oder biotischer (zum Beispiel pathogene Bakterien, Insekten, Pilze) Natur sein und sich negativ auf Wachstum, Entwicklung und Reproduktion auswirken. Um die Signale schnellstmöglich in adaptive Antworten zu übersetzen, bedarf es einer effizienten transkriptionellen Regulation. Demnach ist es nicht überraschend, dass auch Überflutung und Hypoxie zu einer beachtlichen Änderung der Genexpression führen (Branco-Price et al., 2008; Mustroph et al., 2010; Lee et al., 2011; Hsu et al., 2013; Tsai et al., 2014; van Veen et al., 2016; Yeung et al., 2018). Um die Reaktionen von Pflanzen auf Sauerstoffmangel weiter zu entschlüsseln, stand die Charakterisierung der zwei Hypoxie-responsiven Transkriptionsfaktoren AtERF#111 und AtLBD41 im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

4.1 Der Transkriptionsfaktor AtERF#111

4.1.1 AtERF#111 wird durch das Ubiquitin/Proteasom System abgebaut

Mutationen in wichtigen Komponenten des *Arg/N-degdon pathways* führen zu einer Reihe pleiotroper Defekte in der Pflanze. Viele Publikationen der letzten Jahre haben gezeigt, dass der *Arg/N-degdon pathway* neben der Wahrnehmung von Sauerstoff und NO auch mit Antworten auf weitere abiotische Stressfaktoren (Salz, hohe Temperatur, oxidativer Stress) assoziiert wurde (Gibbs et al., 2015; Vicente et al., 2017). Zudem kontrolliert der *Arg/N-degdon pathway* verschiedene Aspekte der Pflanzenentwicklung wie Samenruhe, Samenkeimung, Keimlingsentwicklung oder Stomataschluss (Yoshida et al., 2002; Graciet et al., 2009; Holman et al., 2009; Riber et al., 2015; Gibbs et al., 2016; Vicente et al., 2017; Vicente et al., 2018). Zuletzt wurde darüber hinaus eine Verbindung des *Arg/N-degdon pathways* zur Immunantwort der Pflanze aufgezeigt, und die Inaktivierung essentieller Komponenten des Abbauwegs führte zu einer veränderten Resistenz gegenüber einer Reihe von Pflanzenpathogenen (Marchi et al., 2016; Vicente et al., 2018).

In Arabidopsis beginnen 246 Proteine am N-Terminus mit den Aminosäuren Methionin und Cystein, was in Relation mit den restlichen 19 proteinogenen Aminosäuren eine deutliche Unterrepräsentation darstellt (Dissmeyer, 2019). Trotz der Vielfalt an Funktionen konnten neben den GVIERFs bislang erst zwei weitere Substrate des *Arg/N-degdon pathways* identifiziert werden, VRN2 (Gibbs et al., 2018) sowie ZPR2 (Weits et al., 2019), welche eine Regulation der pflanzlichen Entwicklung mit der Verfügbarkeit von Sauerstoff verknüpfen. Darüber hinaus ist jedoch unklar, wie viele weitere Met-Cys initiiierende Proteine einer Regulation durch den *Arg/N-degdon pathway* unterliegen.

In diesem Zusammenhang wurde der Transkriptionsfaktor AtERF#111 der GXERFs entdeckt, dessen N-terminale Region mit einem Met-Cys Motiv initiiert und in homologen Proteinen anderer Brassicaceae Arten hoch konserviert ist (Abb. 7). Dennoch zeigte die Analyse der Proteinstabilität von AtERF#111 Konstrukten *in vivo*, bei welchen in einer Version das N-terminale Cystein zu einem Alanin mutiert wurde, dass sowohl (MC)AtERF#111 als auch (MA)AtERF#111 instabil waren und unabhängig von ihrem N-Terminus innerhalb von 3 h abgebaut wurden (Abb. 8C). Eine Substitution von Cystein zu Alanin in GVIIERFs sowie in VRN2 und ZPR2 war jedoch ausreichend, um eine Stabilisierung dieser unter normoxischen Bedingungen zu bewirken (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011; Gibbs et al., 2014; Gibbs et al., 2018; Weits et al., 2019). Folglich konnte AtERF#111 nicht als weiteres Substrat des *Arg/N-degron pathways* identifiziert werden.

Nicht alle Proteine, die mit einem N-terminalen Met-Cys initiieren, sind Substrate des *Arg/N-degron pathways*, da N-Degrone gewisse Eigenschaften vorweisen müssen: Neben einem primär destabilisierenden Rest muss ein Lysin an geeigneter Stelle zur Anheftung von Ubiquitin stromabwärts liegen, und die N-terminale Region zudem unstrukturiert und damit zugänglich sein (Gibbs et al., 2016; Dissmeyer et al., 2018; Dissmeyer, 2019). AtERF#111 besitzt in seiner N-terminalen Region drei Lysine (K5, K15, K16), die zudem in homologen Proteinen weiterer Brassicaceae konserviert sind (Abb. 7). Doch selbst nicht alle Proteine, die die Attribute eines funktionellen N-Degrone erfüllen, werden durch den *N-degron pathway* abgebaut. Ein sehr prominentes Beispiel von einem Protein, das trotz seines N-terminalen Met-Cys Motivs und einem in der Theorie funktionalen N-Degron einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* entgeht, ist der für die Überflutungstoleranz wichtige GVIIERF aus Reis, SUB1-A1 (Fukao et al., 2011; Gibbs et al., 2011). Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass der C-Terminus von SUB1-1A sich auf die N-terminale Region zurückfaltet und so verhindert, dass die destabilisierenden Reste durch Komponenten des *Arg/N-degron pathways* erkannt werden (Lin et al., 2019). Die beiden weiteren GVIIERFs aus Reis, OsERF66 und OsERF67, sind zwar ähnlich aufgebaut wie SUB1-1A, werden jedoch durch den *Arg/N-degron pathway* abgebaut (Lin et al., 2019). OsERF66 und OsERF67 werden bei Überflutung durch SUB1A-1 induziert. Womöglich kann Reis durch diese Regulation Überflutung von anderen Stressantworten, die ebenfalls durch SUB1-A1 reguliert werden, unterscheiden (Lin et al., 2019).

Die Halbwertszeit von AtERF#111 könnte auch von anderen posttranslationalen Modifikationen, wie SUMOylierung oder Ubiquitinierung, abhängen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass AtERF#115, ein weiteres Mitglied der GXERFs, durch das Proteasom abgebaut wird (Heyman et al., 2013) und eine Ubiquitinierungsstelle an einem Lysin (K9) in der Nähe seines N-Terminus besitzt (Abb. 39) (Walton et al., 2016). Ein Vergleich der Proteinsequenzen der GXERFs zeigte, dass diese Stelle in

AtERF#111, AtERF#112, AtERF#114 und AtERF#115 konserviert ist, was bedeutet, dass dieses Lysin ebenfalls für eine Ubiquitinierung von AtERF#111 wichtig sein könnte (Abb. 39).

Tatsächlich konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, dass AtERF#111 durch das Ubiquitin/Proteasom System degradiert wird, da eine Inhibierung des Proteasoms durch MG132 in einer Stabilisierung des AtERF#111-Proteins resultierte (Abb. 8D). Da AtERF#111 jedoch keinem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* unterliegt und demnach auch nicht durch PRT6 reguliert wird, bleibt die Frage offen, welche E3-Ligase AtERF#111 letztlich für den Abbau markiert, und welche physiologische Relevanz dies hat.

```

AT5G07310.1_ERF115          -----MANSNGNYGKRPFRGDESEKKEADDDENIFPPFSARSQY-----
AT5G61890.1_ERF114_EBE     -----MYGKRPFGGDESEER---EEDENLFPVFSARSQH-----
AT5G13330.1_ERF113_Rap2.6L -----
AT2G33710.2_ERF112          -----MHSGKRPLS---PESMAGNREEKKEKELCCCSLSESE-----
AT5G64750.1_ERF111_ABR1    MCVLKVANQEDNVGKKAESIRDDDHRTLSEIDQWLYLFAAEDDHRHSFP
AT1G43160.1_ERF108_RAP2.6 -----
AT5G50080.1_ERF110          -----
AT4G34410.1_ERF109_RRTF1   ---MHYPNNRTEFVVGAPAPTRYQKEQLSPEQELSVIVSALQHVISGENET

AT5G07310.1_ERF115          -----DMRAMVSALTQVIGNQSSSHDN-----
AT5G61890.1_ERF114_EBE     -----DMRVMSVALTQVIGNQSSSHDN-----
AT5G13330.1_ERF113_Rap2.6L -----MVSALSRVIEN-----
AT2G33710.2_ERF112          -----DVSDVFVSELT-----
AT5G64750.1_ERF111_ABR1    TQQPPSSSSSSSLISGFSREMEMSAIVSALTHVAVGNVPHQQGGGGSSG
AT1G43160.1_ERF108_RAP2.6 -----MVSMLTNVVSGETEPSASATWTMG-
AT5G50080.1_ERF110          -----MSAMVSALTQVVSARSQTEAEGAHSSSS
AT4G34410.1_ERF109_RRTF1   APCQGFSSDSTVISAGMPRLDSDTCQVCRIEGCLGCNYFFAPNQRIEKN-

```

Abb. 39 | Sequenzvergleich der GXERFs.

N-terminaler Sequenzvergleich der acht GXERFs #108 - #115. In Gelb: potentielle Ubiquitinierungsstelle, die für K9 von ERF#1115 identifiziert wurde (Walton et al., 2016). In Grau: konserviertes Motiv innerhalb der GXERFs (Heyman et al., 2018).

4.1.2 AtERF#111 ist ein Aktivator der Genexpression und steht nicht in Verbindung zur ABA-Signalgebung oder Trockenstress

AtERF#111 wurde zuvor als *ABSCISIC ACID REPRESSOR 1 (ABR1)* bezeichnet, da eine starke Induktion durch exogene ABA-Behandlung gezeigt wurde und ein Funktionsverlust des Gens in einer ABA-Hypersensitivität der Keimung und des Wurzelwachstums resultierte (Pandey et al., 2005). Dennoch konnte anhand der hier durchgeführten Ergebnisse keine Verbindung zwischen AtERF#111 und der ABA-Signalgebung bestätigt werden.

Ein essentieller Unterschied zu den Ergebnissen von Pandey et al. (2005) war, dass die Expression von *AtERF#111* nicht in Reaktion auf ABA modifiziert wurde (Abb. 9C, Abb. 15). Weitere Experimente aus der Literatur unterstützen diesen Befund: Im Kontext eines RNA-Seq Zeitreihen-Experiments, das multiple Zeitpunkte zwischen 1 und 60 h nach Behandlung der Keimlinge mit 10 µM ABA beinhaltete, konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Modifikation der *AtERF#111*-Expression im Vergleich zum WT nachvollzogen werden (Song et al., 2016). Darüber hinaus zeigen Mikroarraydaten von Keimlingen,

die für 6 h mit 10 μ M ABA behandelt wurden, ebenfalls keine Induktion von *AtERF#111* (Liu et al., 2013).

Zusätzlich zu einer Induktion von *AtERF#111* durch ABA beobachteten Pandey et al. (2005) eine höhere Expression ausgewählter ABA-Markergene in *erf#111* im Vergleich zu Col-0. Eine Analyse der ABA-responsiven Gene *AtRAB18* und *AtRD22* zeigte jedoch keine Unterschiede in der Expression zwischen *erf#111-2* und Col-0 (Abb. 9C). Dass darüber hinaus auch die Überexpression von *AtERF#111* zu keiner abgeschwächten Expression der ABA-responsiven Gene führte (vgl. Daten A1), steht erneut im Kontrast mit der These von Pandey et al. (2005). Wäre ABR1 ein ABA-Repressor, dann wäre im Falle der *ERF#111*-OE Linien wiederum ein inhibitorischer Effekt auf ABA zu erwarten gewesen (Abb. 9C).

Die GO-Analysen von DEGs der *ERF#111*-OE Linien sowie direkter *AtERF#111*-Zielgene zeigten keine angereicherten GO-Kategorien, die in Verbindung mit ABA oder Trockenheit stehen (Abb. 19B, Abb. 20D). Auch in dem Mikroarrayexperiment der *ERF#111*-OE Linien wurden keine ABA- oder Trockenstress-responsiven Gene, wie zum Beispiel *AtRD29A*, *AtRD29B*, *AtRD22*, *AtRAB18*, *AtCOR47* oder *AtDREB2A* in ihrer Expression modifiziert (vgl. Daten A1).

Darüber hinaus wurden die Keimung sowie das Wurzelwachstum in Gegenwart von ABA analysiert. In Arabidopsis wird der Embryo durch ein Nährgewebe (Endosperm) und die Samenschale umgeben. Die Keimung umfasst die Entwicklung des Samens und des darin befindlichen Embryos und ist per Definition abgeschlossen, sobald die Keimwurzel (Radikula) in das Endosperm vorgedrungen ist (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Holdsworth et al., 2008). Das Phytohormon ABA fördert in frühen Stadien der Embryogenese das embryonale Wachstum sowie die Bildung von Speicherproteinen und -lipiden, im späteren Stadium der Embryogenese inhibiert ABA jedoch die Keimung und erhält die Keimruhe aufrecht (Finkelstein et al., 2002). Äußerlich zugeführtes ABA wird trotz eines intakten Samenmantels schnell von dem Embryo aufgenommen (Schopfer et al., 1979). Die molekularen Mechanismen, welche dazu führen, dass hohe exogene ABA-Konzentrationen das Wurzelwachstum inhibieren, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und viele Komponenten wie Auxin, Ethylen, ROS und Ca^{2+} scheinen involviert (Luo et al., 2014; Li et al., 2017; Sun et al., 2018).

Sowohl bei der Analyse der Keimung als auch des Wurzelwachstums konnten keine Unterschiede zwischen Col-0 und *erf#111* auf ABA-haltigem Medium detektiert werden und auch die *ERF#111*-OE Linien zeigten keine ABA-Insensitivität (Abb. 9A, B, Abb. 10, Abb. 11). Dass die angewandte ABA-Behandlung dennoch wirksam war, wurde mit Hilfe bereits publizierter Mutanten, die eine modifizierte ABA-Antwort aufweisen, bestätigt: *prt6-1* (Holman et al., 2009) war ABA-hypersensitiv, die Quadrupel-Mutante des ABA Rezeptors *pyr1 pyl1 pyl2 pyl4* (Park et al., 2009) war ABA-insensitiv

(Abb. 10, Abb. 11). Diese Resultate standen daher im Widerspruch zu den Ergebnissen von Pandey et al. (2005).

Die Synthese des Phytohormons ABA wird durch abiotische Stressfaktoren, die zu einem Wasserdefizit und osmotischem Stress führen, wie etwa Salz, niedrige Temperatur und vor allem Trockenstress, induziert. In der Folge werden viele Gene, die durch exogenes ABA induziert werden, ebenfalls durch Trockenheit induziert (Finkelstein et al., 2002; Seki et al., 2002; Cutler et al., 2010; Sah et al., 2016). Zusätzlich zu einer Induktion von *AtERF#111* durch ABA beobachteten Pandey et al. (2005) auch eine Anreicherung des Transkripts bei Trockenstress. In diesem Zusammenhang wiesen bereits publizierte Datensätze widersprüchliche Ergebnisse auf: Ein Mikroarrayexperiment von Nishiyama et al. (2013) zeigte keinen Effekt von Trockenstress auf die Expression von *AtERF#111*, während die Daten von Ha et al. (2014) eine Induktion von *AtERF#111* in Reaktion auf Trockenheit implizierten. Die Realisierung des Trockenstresses unterschied sich jedoch methodisch in den korrespondierenden Experimenten: Nishiyama et al. (2013) ließen die Pflanzen progressiv in den Erdtöpfen trocknen, indem diese nicht mehr gegossen wurden, wohingegen Ha et al. (2014) den überirdischen Teil der Pflanze abtrennten und zur Trocknung auf ein Papier legten.

Durch Reproduktion beider Versuchsabläufe konnte beobachtet werden, dass der Trockenstress-Marker *AtRAB18* in beiden Experimenten induziert wurde, was einen Trockenstress sowohl in Erde als auch auf Papier unter Beweis stellte (Abb. 12). Im Falle des progressiven Trockenstresses in Erde konnte jedoch keine Änderungen der Expression von *AtERF#111* detektiert werden, was wiederum die Ergebnisse von Nishiyama et al. (2013) bestätigte (Abb. 12). Analog zu Ha et al. (2014) wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Pflanzen auf Papier getrocknet, aber anstatt die Genexpression zu intakten Pflanzen in Erde zu vergleichen, wurde eine neue Kontrollbedingung eingeführt, in welcher die Wurzeln der auf Papier exponierten Pflanzen mit feuchtem Papier bedeckt wurden, um eine Austrocknung dieser zu verhindern (Abb. 12). Hierbei konnte gezeigt werden, dass *AtERF#111* sehr stark durch mechanischen Stress induziert wird, welcher entsteht, sobald die Pflanze aus der Erde entfernt wird und auf das Papier platziert wird. Dieses Erkenntnis unterstreicht die Wichtigkeit von entsprechenden Kontrollbehandlungen, die möglichst ähnlich die eigentliche Stressbehandlung simulieren. Folglich konnten durch die Studie von Ha et al. (2014) nicht nur Gene identifiziert werden, die durch Trockenheit induziert werden, sondern auch jene, die durch mechanischen Stress induziert werden. Eine Unterscheidung war in diesem Kontext nicht möglich.

Davon abgesehen konnte aus weiteren Experimenten geschlossen werden, dass *AtERF#111* keinen Repressor, sondern einen Aktivator der Transkription darstellt: Alle direkten Zielgene von *AtERF#111*, die mittels DEX-abhängiger nuklearer Lokalisation von *AtERF#111* und simultan inhibierter Proteinsynthese identifiziert wurden, wurden signifikant induziert und keines der Gene wurde signifikant reprimiert.

miert (Abb. 20B, E). Weiterführend wurden die Promotoren der Zielgene durch AtERF#111 aktiviert (Abb. 21). Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse, dass AtERF#111 ein transkriptioneller Aktivator ist, der weder in die ABA-Signalgebung noch in die Antwort auf Trockenstress involviert ist.

4.1.3 AtERF#111 ist in die Verwundungsantwort involviert

Die Expression von *AtERF#111* wurde sehr stark durch mechanischen Stress reguliert: Das *AtERF#111*-Transkript wurde mehr als 300-fach innerhalb einer Stunde nach Verwundung induziert und kehrte nach 6 h auf ein anfängliches Niveau zurück (Abb. 13). Stabil transformierte fLUC-Reporterlinien, die unter Kontrolle von *prAtERF#111* standen, zeigten zudem ein klares Lumineszenz-Signal an den verwundeten Stellen der Rosettenblätter (Abb. 14).

Mechanische Verwundung aktiviert eine Kaskade von Abwehrantworten der Pflanze, die eine große Ähnlichkeit zu den durch Herbivore und Insekten hervorgerufen Schutzmechanismen aufweisen (Maffei et al., 2007; Raymond & Segrè, 2006; Rehrig et al., 2014). Bei Verwundung entstehen die Antworten zunächst lokal an der verletzten Stelle (lokale Antwort), während unverletzte Gewebe erst später reagieren (systemische Antwort). Schon wenige Minuten nach Verwundung setzt in der Pflanze eine lokale Produktion von ROS ein. Die systemische Akkumulation von H₂O₂ kann in Blättern nach ca. einer Stunde detektiert werden und erreicht nach 4 - 6 h ein Maximum, bevor diese wieder abnimmt (Orozco-Cardenas & Ryan, 1999). Verwundung induziert zudem die *de novo*-Synthese von Jasmonsäure (JA), ABA und Ethylen, welche wiederum ein Netzwerk von Signalwegen aktivieren, die die Abwehrantwort koordinieren (Peña-Cortés et al., 1995; Bergey et al., 1999; Bouquin et al., 1997). Im Einklang mit einer Funktion in der Verwundungsantwort konnte für *AtERF#111* eine Induktion durch H₂O₂ und MeJA, dem Methyl ester von JA, gezeigt werden (Abb. 15). Zudem bestätigen weitere Expressionsdaten aus der Literatur, dass *AtERF#111* durch eine Applikation von JA induziert wird und die Expression zudem durch Fraßfeinde hochreguliert wird (Taki et al., 2005; Rehrig et al., 2014).

Die Vertreter der Pflanzenabwehrgene *AtPDF1.2a*, *AtPDF1.2b*, *AtPDF1.2c* und *AtPDF1.3* wurden durch *ERF#111*-OE sehr stark im Spross induziert (alle SLR > 4, vgl. Daten A1). Pflanzen-Defensine sind kleine basische Peptide, die eine eindeutige Sequenzähnlichkeit aufweisen, welche auf acht strukturell wichtigen Cysteinen beruht (Broekaert et al., 1995; García-Olmedo et al., 1998; Lacerda et al., 2014). Sie verhindern das Wachstum einer großen Anzahl von Pilzen und schützen so die Pflanze vor Pathogenbefall. In *A. thaliana* gibt es 13 potentielle PDF-Gene, welche für elf verschiedene Pflanzen-Defensine codieren (Thomma et al., 2002). Viele Pflanzen-Defensine zeigen ein konstitutives Expressionsmuster und werden durch Pathogenbefall, Verwundung und weitere abiotische Stressfaktoren induziert (de Beer & Vivier, 2011).

Die Mikroarrayanalyse der *ERF#111*-OE Pflanzen im Spross zeigte eine signifikante Überlappung mit Genen, die durch Verwundung induziert wurden (Abb. 19A). Die GO-Analyse der DEGs in *ERF#111*-OE transgenen Pflanzen verdeutlichte zudem eine Anreicherung der Kategorien „Antwort auf externe Stimuli“, „Abwehrantwort“ oder „Antwort auf einen anderen Organismus“ (Abb. 19B), was wiederum die Hypothese einer Involvierung von AtERF#111 in die Verwundungs- bzw. Abwehrantwort unterstützt.

Es konnten insgesamt 109 Gene als direkte Zielgene von AtERF#111 identifiziert werden (Abb. 20B), welche eine Anreicherung des GO-Terms Verwundungsantwort widerspiegeln (Abb. 20D). Beim Vergleich der verschiedenen Mikroarray-Datensätze konnten 15 Gene ausfindig gemacht werden, deren Expression sowohl durch Verwundung als auch durch *ERF#111*-OE induziert wurde (Abb. 20C). Im Rahmen eines Transaktivierungsexperiments in Protoplasten war AtERF#111 in der Lage, die Promotoren der Zielgene *AtPDF1.2a*, *AtTH8*, *AtCYP71B22* und *AtEXPA1* signifikant zu aktivieren (Abb. 21). Beim Vergleich der Genexpression nach Verwundung zwischen Col-0 und *erf#111-2* mittels Mikroarray konnten keine Gene identifiziert werden, welche signifikant differentiell exprimiert wurden (Abb. 20E, vgl. Daten A1). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass AtERF#111 nicht den alleinigen Regulator der Zielgene in Reaktion auf Verwundung darstellt.

Eine zusätzliche RT-qPCR Analyse ausgewählter Zielgene in Col-0 und *erf#111* unter Kontrollbedingungen und nach Verwundung brachte hervor, dass *AtTH8* das einzige der getesteten Gene war, das signifikant schwächer in *erf#111-2* nach Verwundung exprimiert wurde (Abb. 22B). Bei *AtTH8* handelt es sich um ein *h*-Typ Thioredoxin. Im Allgemeinen sind Thioredoxine kleine Proteine, die als Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen agieren und in die Regulation des Redox-Milieus in der Zelle involviert sind (Gelhaye et al., 2005). Arabidopsis-Thioredoxine sind in mindestens fünf verschiedene Familien unterteilt (f, m, x, o und h), wobei die Gruppe h aus acht Genen besteht, welche in Arabidopsis für cytosolische Proteine codieren (Meyer et al., 2002; Reichheld et al., 2002). Für ein Mitglied dieser Gruppe, AtTRXh5, wurde eine Induktion bei Verwundung, Abszission und Seneszenz sowie bei Kontakt mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* gezeigt (Laloi et al., 2004). Darüber hinaus wird AtTRXh5 für die Antwort auf Victorin benötigt, einem Phytotoxin, welches den programmierten Zelltod in sensitiven Pflanzen hervorruft (Sweat & Wolpert, 2007; Lorang et al., 2012). Für AtTH8 sind nur sehr wenige Informationen verfügbar, dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit eine klare Induktion durch Verwundung gezeigt und AtTH8 als direktes Zielgen von AtERF#111 identifiziert werden (Abb. 20E, Abb. 22B). Die Expression von *AtTH8* war in *erf#111-2* nach Verwundung zwar schwächer als im WT, jedoch immer noch höher als unter Kontrollbedingungen (Abb. 22B). Der Funktionsverlust von AtERF#111 könnte demnach durch redundant agierende TFs kompensiert werden.

Tatsächlich werden einige der acht Mitglieder der GXERFs in Arabidopsis ebenfalls stark durch Verwundung induziert, darunter *AtERF#108/AtRAP2.6*, *AtERF#109/AtRRTF1*, *AtERF#112*, *AtERF#113/AtRAP2.6L*, *AtERF#114* und *AtERF#115* (Abb. 23) (Ikeuchi et al., 2017). Erst kürzlich wurde die Hypothese publiziert, dass Mitglieder der GXERFs die Stress-Signalgebung koordinieren, indem Wundheilungsmechanismen aktiviert werden (Heyman et al., 2018). Mit Ausnahme von *AtERF#112* teilen die GXERFs ein konserviertes Motiv nahe des N-Terminus (Abb. 39). Für *AtERF#111* und *AtERF#115* wurde gezeigt, dass dieses Motiv für eine Heterodimerisierung mit TFs des GRAS-Domänen-Typs wichtig ist – eine Interaktion, welche GXERFs in hoch potente Aktivatoren der Zellteilung umwandelt (Heyman et al., 2016; Heyman et al., 2018).

Interessanterweise wird die Expression eines weiteren Mitglieds der GXERFs, *AtERF#109* (auch genannt *REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR/RRTF1*), durch die TFs WRKY18, 40 und 60 reguliert und ist neben Verwundung stark responsiv gegenüber JA und ROS (Wang et al., 2008; Pandey et al., 2010; Matsuo et al., 2015). Im Kontext einer genomweiten Bindungsstudie konnte herausgefunden werden, dass *AtERF#111* ein Ziel von WRKY18, 33 und 40 darstellt, welche wiederum die Pathogen-induzierte Immunantwort der Pflanze stimulieren (Birkenbihl et al., 2017). Zudem enthielt dieser Datensatz die Information, dass *AtERF#112* und *AtERF#115* ebenfalls Ziele von WRKY18, 33 und 40 darstellen, bzw. *AtERF#109* von WRKY18 und 40. Es besteht die Hypothese, dass *AtERF#109* wichtig ist, um die Balance von ROS innerhalb der Zelle zu halten (Matsuo et al., 2015). *ERF#109-OE* Pflanzen wiesen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen *Alternaria brassicae* auf, welche durch Antioxidantien oder Radikal-Fängern abgeschwächt werden konnte (Matsuo et al., 2015). Darüber hinaus zeigten *rrtf1*-Mutanten keine auffälligen Phänotypen, wohingegen eine Überexpression von *AtERF#109* zu einer erhöhten Produktion und Elongation der Wurzelhaare führte (Cai et al., 2014). Korrespondierend dazu führte eine Überexpression von *AtERF#111* ebenfalls zu einem vergleichbaren Wurzelhaarphänotyp (Abb. 16B, C). Mikrotomschnitte der *ERF#111-OE* Linien zeigten zudem, dass die Wurzelhaare nicht nur in Haarzellen produziert wurden, sondern auch in Nicht-Haarzellen, die normalerweise keine Wurzelhaare ausbilden (Abb. 17). Das Phänomen ektopischer Wurzelhaarentwicklung in Nicht-Haar-Zellen wurde auch bei Phosphat- oder Eisenmangel beobachtet (Müller & Schmidt, 2004).

Ein Kandidatengen, welches für den Wurzelhaarphänotyp der *ERF#111-OE* Pflanzen verantwortlich sein könnte, ist *AtEXPA1*, da ansonsten keine Wurzel- oder Epidermis-spezifischen Gene in ihrer Expression modifiziert wurden und *AtEXPA1* zudem ein direktes Zielgen von *AtERF#111* darstellt (Abb. 20E). Expansine sind Proteine, welche in eine Lockerung der Zellwand involviert sind (Cosgrove, 2000; Choi et al., 2006). Für *AtEXPA7*, ein weiteres Mitglied der Expansine in Arabidopsis, wurde gezeigt, dass es die Wurzelhaarbildung sowie das Wurzelwachstum beeinflusst (Choi et al., 2006; Cho & Cosgrove,

2002). Es wurde demonstriert, dass *AtEXPA1* durch Cytokinin, das wiederum in die Kontrolle der Initiation der Zelldifferenzierung involviert ist, induziert wird (Bhargava et al., 2013; Pacifici et al., 2015). Interessanterweise war die Entwicklung der Wurzelhaare in *expa1* Mutanten verzögert, was ein Problem bei der Zelldifferenzierung implizierte (Pacifici et al., 2018). Diese Daten unterstützen demnach die Hypothese, dass *AtEXPA1* in Verbindung mit dem Wurzelhaar-Phänotyp der *ERF#111*-OE Pflanzen steht.

4.1.4 Steht die Induktion von AtERF#111 in Verbindung zu mechanischem Stress bei Überflutung?

Die Expression von *AtERF#111* wurde durch Hypoxie und Überflutung induziert (Abb. 4A - D). Datensätze von RNA- sowie Ribosomen-Sequenzierung bestätigen die Induktion bei Überflutung, welche zudem Spross-spezifisch ist (van Veen et al., 2016; Yeung et al., 2018).

AtERF#111 scheint kein Zielgen der GVIERFs zu sein, da der Promotor von *AtERF#111* kein HRPE enthält und zudem keine Unterschiede in der Expression zwischen Col-0 und der *Arg/N-degron pathway* Mutante *prt6-1* detektiert werden konnten (Abb. 4D). Es konnte zudem keine veränderte Überlebensrate bei Überflutung bei Col-0 und *erf#111-2* ausgemacht werden, was die Annahme stärkt, dass Mitglieder der GXERFs redundant agieren könnten und einen Funktionsverlust von *AtERF#111* kompensieren (Abb. 6). Tatsächlich werden die Mitglieder der GXERFs *AtERF#108*, *AtERF#112*, *AtERF#113* sowie *AtERF#114* ebenfalls durch Überflutung (Lee et al., 2011; Hsu et al., 2013; Yeung et al., 2018) sowie *AtERF#108*, *AtERF#109*, *AtERF#113* und *AtERF#114* durch Wiederbelüftung nach Hypoxie (Branco-Price et al., 2008; Tsai et al., 2014) induziert.

AtERF#111 scheint zudem keinen Hauptregulator der anaeroben Antwort darzustellen. Nur eines der 49 *core* Hypoxie-responsiven Gene (Mustroph et al., 2009), *RHODANESE*, wurde durch eine stabile Überexpression von *AtERF#111* in Wurzel und Spross induziert und wurde zudem als direktes Zielgen von *AtERF#111* identifiziert (Abb. 20E). Eine Expressionsanalyse zeigte jedoch keine differentielle Expression bei Hypoxie im Vergleich von Col-0 und *erf#111-2* (Abb. 22G).

Beim Vergleich aller durch *ERF#111*-OE differentiell exprimierter Gene zu Mikroarraydaten bei Überflutung (Hsu et al., 2013) konnte eine signifikante Überlappung beider Datensätze festgestellt werden (Abb. 19A). Überflutung ist ein Stressfaktor für die Pflanze, welcher aus vielen verschiedenen Komponenten besteht. Neben einer geringen Verfügbarkeit von Sauerstoff stellen auch eine geringe Lichtverfügbarkeit, Nährstoffmangel, ein hohes Infektionsrisiko sowie mechanischer Stress eine Herausforderung für die Pflanze dar. In der Konsequenz werden daher sehr viele Gene bei Überflutung in ihrer Expression modifiziert, unter anderem Mitglieder der WRKY TF-Familie (Hsu et al., 2013). WRKY22 aktiviert zum Beispiel in Folge von Überflutung die Immunantwort der Pflanze und erhöht so die Resistenz gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas syringae* (Hsu et al., 2013).

Neben *WRKY22* werden auch *WRKY18*, *33* und *40* signifikant durch Überflutung (Hsu et al., 2013), Anoxie (Tsai et al., 2014) sowie Verwundung (Wang et al., 2015) hochreguliert. Da *AtERF#111* wie bereits erwähnt als Zielgen von *WRKY18*, *33* und *40* identifiziert wurde (Birkenbihl et al., 2017), könnte demnach auch die Regulation von *AtERF#111* mit mechanischem Stress bei Überflutung zusammenhängen. Da *AtERF#111* jedoch nicht nur durch Überflutung (Abb. 4A), sondern auch durch alleinige Hypoxie (Abb. 4B) induziert wird, könnte man auch vermuten, dass überflutete Pflanzen darauf vorbereitet werden, mechanischem Stress ausgesetzt zu werden, sobald die Flut zurückgeht, da die Hypoxie-Behandlung eine niedrige Sauerstoffverfügbarkeit während der Überflutung simuliert.

4.2 Der Transkriptionsfaktor AtLBD41

4.2.1 AtLBD41 als Repressor der Transkription bei Sauerstoffmangel

Hypoxische Bedingungen führen zu einer beachtlichen Rekonfiguration des pflanzlichen Transkriptom, welche durch ein komplexes Netzwerk von Aktivatoren, Repressoren, Co-Aktivatoren und Co-Repressoren bewerkstelligt wird (Branco-Price et al., 2008; Mustroph et al., 2009; Mustroph et al., 2010; Lee et al., 2011; Tsai et al., 2014). Wichtige Regulatoren sind die fünf Mitglieder der GVIIFs, die bei Sauerstoffmangel stabilisiert werden (Gibbs et al., 2011; Licausi et al., 2011) und als transkriptionelle Aktivatoren die Promotoren der Hypoxie-responsiven Gene induzieren (Bui et al., 2015; Papdi et al., 2015; Gasch et al., 2016). Bislang ist nur wenig über die Mechanismen der Hypoxie-abhängigen Genrepression bekannt, dabei wird bei Sauerstoffmangel eine vergleichbare Anzahl an Genen sowohl induziert als auch reprimiert (Tsai et al., 2014).

Eines der Gene, das besonders stark durch Hypoxie induziert wird, codiert für den Transkriptionsfaktor AtLBD41 (Mustroph et al., 2009). Gasch et al. (2016) zeigten, dass AtRAP2.2, AtRAP2.3 und AtRAP2.12 signifikant den Promotor von *AtLBD41* durch Bindung an ein bestimmtes *cis*-Element, dem HRPE, aktivieren. Die konstitutive Überexpression der nativen Version von *AtRAP2.12* führt zu einer verbesserten Überlebensrate nach Überflutung oder Hypoxie, wohingegen die Akkumulation einer Version von *AtRAP2.12*, die insensitiv gegenüber einem Abbau durch den *Arg/N-degron pathway* ist, die Stresstoleranz verschlechtert (Licausi et al., 2011). Eine exzessive Induktion Hypoxie-responsiver Gene ist demnach durchaus nachteilhaft für die Pflanze, und vor allem bei fluktuierenden Sauerstoffkonzentrationen bedarf es einer effizienten und vor allem auch transienten transkriptionellen Antwort.

Um den ATP-Verbrauch zu ökonomisieren, wird zum Beispiel die Transkription und/oder Translation von Genen, deren Funktion bei Sauerstoffmangel nicht überlebensnotwendig ist, heruntergefahren (Branco-Price et al., 2008; Lee & Bailey-Serres, 2019). Interessanterweise besitzt AtLBD41 am C-Terminus eine EAR-Domäne (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009), welche essentiell für die reprimierenden Eigenschaften von aktiven Repressoren ist.

Im Allgemeinen kann man zwischen aktiven und passiven Repressoren der Transkription unterscheiden (Kagale & Rozwadowski, 2011). Passive Repressoren besitzen kein intrinsisches Repressormotiv. Sie kompetitieren mit transkriptionellen Aktivatoren um eine DNA-Bindestelle oder inaktivieren die Aktivatoren durch die Ausbildung von Heterodimeren. Exemplarisch für passive Repressoren sind JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) Proteine aus Arabidopsis, die Schlüsselaktivatoren der JA-Antwort bei niedrigen JA-Konzentrationen, wie MYC2, MYC3, MYC4 und MYC5, negativ regulieren (Chini et al., 2007; Goossens et al., 2015). Hierbei bindet das JAZ Protein an den N-Terminus

von MYC und verhindert so eine Wechselwirkung mit dem Mediator-Komplex (Çevik et al., 2012; Chen et al., 2012; Zhang et al., 2015). Ein weiteres Beispiel für passive Repression ist der Hypoxie-responsive Transkriptionsfaktor HRA1. Bei Sauerstoffmangel interagiert HRA1 mit dem GVIIFERF RAP2.12, wodurch dieser in seiner aktivierenden Funktion inhibiert wird (Giuntoli et al., 2014; Giuntoli et al., 2017).

Aktive Repressoren enthalten hingegen eine distinkte Repressordomäne. In Pflanzen wurden bislang mindestens vier Motive, welche die Transkription aktiv unterbinden, identifiziert: das EAR-Motiv (Ohta et al., 2001), das TILLER Motiv (Matsui et al., 2008), das R/KLFGV Motiv (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009) sowie das LxLxPP Motiv (Paponov et al., 2009), wobei die EAR-Motiv-vermittelte Repression in Pflanzen zu dominieren scheint (Kagale et al., 2010). Transkriptionsfaktoren mit einer EAR-Domäne können mit anderen TFs interagieren oder die Chromatinstruktur durch Histonmodifikationen modulieren. Hierbei werden durch Interaktion mit Co-Repressoren wie SIN3 ASSOCIATED POLYPEPTIDE 18 (SAP18) oder TPL Histon-Deacetylasen (HDACs) rekrutiert, wodurch das Chromatin unzugänglich und damit die Transkription inhibiert wird (Song et al., 2005; Song & Galbraith, 2006; Hill et al., 2008; Causier et al., 2012; Yang et al., 2018). Die Interaktion mit dem Co-Repressor erfolgt dabei über die EAR-Domäne (Causier et al., 2012; Kagale et al., 2010; Kagale & Rozwadowski, 2011).

Da für AtLBD41 eine Interaktion mit TPL und TOPLESS related Proteinen gezeigt wurde (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009), wird von einem Mechanismus der Repression mittels Rekrutierung von Histon-Deacetylasen ausgegangen. In Übereinstimmung mit einer Funktion als Repressor konnten keine Transaktivierungseigenschaften von BD-AtLBD41 auf die Transkription von 4xGAL4UAS-LUC detektiert werden (Abb. 25). Zudem zeigte die Transregulierungsanalyse der Promotoren von *AtPAP1*, *AtPUP10* und *AtAOX1D* aufgrund relativ hoher Basalaktivitäten eine Tendenz zur Repression durch AtLBD41 auf, wohingegen alle getesteten Promotoren durch AtLBD41ΔEAR:VP16 induziert wurden (Abb. 29A, B). Bei letzterem wurde die EAR-Domäne durch die starke virale Transaktivierungsdomäne VP16 ersetzt. Viele Publikationen der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine Fusion mit VP16 transkriptionelle Repressoren in Aktivatoren umfunktionieren kann (Koo et al., 2010; Hanano & Goto, 2011; Chen et al., 2011; Shih et al., 2013; Fujiwara et al., 2014). Auch in stabilen *LBD41*-OE Linien konnte eine Repression des potentiellen Zielgens *AtPUP10* in Vergleich zum Wildtyp mittels RT-qPCR detektiert werden (Abb. 36C).

Das Transkript von *AtLBD41* wird stark durch Hypoxie in der ganzen Pflanze induziert, fällt bei Wiederbelüftung jedoch schnell auf ein basales Expressionsniveau zurück (Hsu et al., 2013; Tsai et al., 2014). Im Rahmen der Arbeit wurde festgestellt, dass putative Zielgene bei Sauerstoffmangel reprimiert und bei Wiederbelüftung induziert werden - *vice versa* zum Expressionsmuster des nativen *AtLBD41* (Abb. 28). Dieser Zusammenhang stützt die These, dass AtLBD41 als Repressor agiert und seine Zielgene bei Sauerstoffmangel herunterreguliert. Der rasche Abfall der *AtLBD41*-Transkriptmenge bei

Wiederbelüftung spricht für eine transiente Antwort, die der Pflanze vor allem eine Anpassung an fluktuierende Sauerstoffkonzentrationen ermöglichen könnte. *AtLBD41* reguliert zudem seinen eigenen Promotor (Abb. 29C). Nach den vorhandenen Daten würde es seine eigene Expression ab einem bestimmten Schwellenwert wieder selbst ausschalten. Dies impliziert, dass die transkriptionelle Aktivierung von *AtLBD41* bei normoxischen Bedingungen von der Stabilität der GVIIFs abhängt, bei hypoxischen Bedingungen sogar von *AtLBD41* selbst. Auch für *AtHRA1*, einem weiteren TF unter den 49 *core* HRGs, konnte neben einer inhibierenden Wirkung auf *AtRAP2.12* eine Repression des eigenen Promotors festgestellt werden, was eine transiente Hypoxieantwort ermöglicht (Giuntoli et al., 2014).

4.2.2 Ermöglicht *AtLBD41* eine Rückkehr zur zellulären Homöostase nach Überflutung?

Um den Effekt der Überexpression von *AtLBD41* auf das Transkriptom zu analysieren, wurden *WT_AtLBD41* und *AtLBD41ΔEAR:VP16* transient in Arabidopsis-Protoplasten exprimiert. Die subsequente Mikroarrayanalyse brachte eine Liste von 323 Genen hervor, welche durch *AtLBD41ΔEAR:VP16* signifikant induziert wurden, und 17 Gene, welche durch *Wt_AtLBD41* signifikant reprimiert wurden. Insgesamt wurden acht Gene identifiziert, die sowohl durch eine Überexpression von *WT_AtLBD41* reprimiert als auch durch *AtLBD41ΔEAR:VP16* induziert wurden. Ein Vergleich der Zielgene mit Mikroarraydaten von Tsai et al. (2014) zeigte, dass diese Gruppe von Genen durch Hypoxie reprimiert wurde und bei anschließender Wiederbelüftung erneut induziert wurde. Ferner konnte bestätigt werden, dass *AtLBD41* die Promotoren der ausgewählten Zielgene *AtLBD39*, *AtPGDH2*, *AtPAP1*, *AtPUP10*, *AtGGT4* und *AtAOX1D* reguliert (Abb. 29A, B). Die Funktion der Gene in Relation zu Sauerstoffmangel ist jedoch weitestgehend unbekannt.

AtLBD39 und *AtPAP1* wurden mit der Antwort auf Stickstoffmangel in Verbindung gebracht (Rubin et al., 2009). *AtLBD39* wie auch seine Homologen *AtLBD37/38* werden durch Stickstoff und Nitrat induziert und inhibieren in Folge *AtPAP1/2* sowie weitere Stickstoff-responsive Gene (Rubin et al., 2009). *AtPAP1* und 2 sind positive Schlüsselregulatoren von Genen der Flavonoid-/Anthocyan synthese, welche für Chalcon-Synthase, Dihydroflavonol 4-Reduktase und Gluthathion-S-Transferase codieren (Borevitz et al., 2000; Scheible et al., 2004; Tohge et al., 2005; Morcuende et al., 2007; Wangwattana et al., 2008). Bei Stickstoffmangel werden *AtLBD37/38/39* nicht induziert, wodurch *AtPAP1* aktiv ist und Anthocyane synthetisiert werden können (Rubin et al., 2009). Im Gegensatz zu *AtLBD37/38/39* wird *AtLBD41* nicht durch einen Stickstoffüberschuss induziert (Rubin et al., 2009). Es wäre demnach denkbar, dass *AtLBD41* die Anthocyan synthese in Antwort auf einen anderen Umweltreiz reguliert, da die Expression von *AtPAP1* nicht nur durch Stickstoffmangel, sondern auch durch eine hohe Lichtexposition (Cominelli et al., 2008) sowie durch ROS (Xu et al., 2017) reguliert wird.

Das putative Zielgen *AtPUP10* wird bei Hypoxie deutlich reprimiert (SLR -5, Tsai et al. 2014). Dabei handelt es sich um eines von 21 Mitgliedern der *purine uptake permease-like* Genfamilie aus Arabidopsis, welche bislang nur wenig charakterisiert wurde. AtPUP1 und AtPUP2 sind kleine, integrale Membranproteine, die Adenin und Cytokinin wahrscheinlich im Symport mit Protonen über die Plasmamembran transportieren, jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen (Gillissen et al., 2000; Bürkle et al., 2003). Es wird angenommen, dass verschiedene Mitglieder der PUP-Familie einen Transport von Cytokinin, welches hauptsächlich im Apikalmeristem in der Wurzel gebildet wird, in andere Organe der Pflanze ermöglichen.

3-Phosphoglycerat Dehydrogenase (PGDH) ist das erste Enzym der phosphorylierungsabhängigen L-Serin Biosynthese in Plastiden, welches neben dem Glykolatweg in den Mitochondrien eine weitere Quelle für Serin darstellt und wahrscheinlich in der Nacht und/oder in nicht photosynthetisch aktiven Organen benötigt wird (Ho & Saito, 2001; Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013). PGDH oxidiert 3-Phosphoglycerat, welches aus Glykolyse und Calvin-Zyklus stammt, zu 3-Phosphohydroxypyruvat (Ros et al., 2013; Ros et al., 2014; Häusler et al., 2014). Arabidopsis codiert drei *PGDH*-Isoformen, *AtPGDH1*, *AtPGDH2* und *AtPGDH3*, welche sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden (Ros et al., 2014). *AtPGDH2* wird vor allem in Wurzeln, aber auch in Spross, Blättern und Blüten exprimiert (Benstein et al., 2013; Toujani et al., 2013). Die Aminosäure L-Serin ist essentiell für die Synthese einer Vielzahl von Biomolekülen, darunter Nukleotide, Phospholipide, Sphingolipide oder Aminosäuren wie zum Beispiel Cystein. Interessanterweise wurde gezeigt, dass Salzstress, Kälteeinwirkung oder Überflutung zu Änderungen in den Transkriptmengen beteiligter Enzyme der L-Serin-Biosynthese in den Plastiden führt (Ho & Saito, 2001). Demnach könnte AtLBD41 die Verfügbarkeit von Serin bei Überflutung regulieren, wobei diese zunächst reprimiert wird und bei Wiederbelüftung und dem Rückgang der Flut aktiviert wird. Nach 2 h Hypoxie konnten im Rahmen von Metabolom-Studien keine Änderungen des Seringehalts in Arabidopsis-Keimlingen detektiert werden (Mustroph et al., 2014), nach 48 h Hypoxie wurde in Arabidopsis-Wurzeln (Blätter wurden hier nicht analysiert) ein leichter Anstieg des Seringehaltes festgestellt (van Dongen et al., 2009; Narsai et al., 2011). Interessant wären in diesem Zusammenhang jedoch Daten des Metabolitgehalts während und vor allem nach Überflutung. Eine Studie aus Reis hatte gezeigt, dass Serin neben vielen weiteren Aminosäuren bei Überflutung in der Pflanze akkumuliert und nach dem Rückgang der Flut auf ein basales Niveau zurückkehrt. Interessanterweise wurde jedoch eine stärkere Akkumulation von Serin in der überflutungstoleranten Art (*Oryza sativa ssp. japonica* cv. M202) im Vergleich zur überflutungstoleranten Art (M202(Sub1)) beobachtet (Barding et al., 2013).

AtGGT4 codiert für eine Gamma-Glytanyltranspeptidase und initiiert den Abbau von Glutathion-Konjugaten in der Vakuole (Grzam et al., 2007; Ohkama-Ohtsu et al., 2007). Glutathion ist ein Hauptregulator der Redox-Homöostase der Zellen und ist in die Abwehr gegen abiotische und biotische Stressfaktoren involviert (Foyer & Noctor, 2011; Noctor et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass die Konzentration von Glutathion bei Überflutung im Vergleich zur Kontrollbehandlung gleich bleibt, jedoch bei Wiederbelüftung nach Überflutung signifikant in der Pflanze ansteigt (Yeung et al., 2019). Es wäre demnach denkbar, dass *AtLBD41* den Gamma-Glytanyl-Zyklus der Pflanze beeinflusst und sich damit auf die Redox-Homöostase der Zelle auswirkt.

AtAOX1D codiert für eine alternative Oxidase und ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Juszczuk & Rychter, 2003). In den Mitochondrien höherer Pflanzen gibt es zwei Wege, wie Elektronen von Ubiquinol auf Sauerstoff übertragen werden können: Den Cytochrom-c-Oxidase (COX) Weg oder den Weg über alternative Oxidasen (AOX). Während im COX-Weg der Elektronentransport an eine Translokation von Protonen und eine damit einhergehende ATP-Bildung gekoppelt ist, so werden im AOX-Weg die Elektronen von Ubiquinol direkt auf Sauerstoff übertragen. Es entsteht kein ATP und die Energie wird in Form von Wärme freigesetzt (Millar et al., 2011). Der alternative Weg ermöglicht es jedoch der Pflanze, überschüssige Elektronen aus den Mitochondrien zu entfernen und so einer Entstehung von ROS entgegenzuwirken. In *Arabidopsis* existieren fünf verschiedene AOX-Gene, *AtAOX1A-1D* und *AtAOX2* (Polidoros et al., 2009), welche einer Zell-, Gewebe-, Organ- und sogar Stress-spezifischen transkriptionellen Regulation unterliegen (Clifton et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass das Transkript von *AtAOX1D* wahrscheinlich durch einen Anstieg des zellulären ROS-Gehalts induziert wird (Strodtkötter et al., 2009).

Pflanzen sind während der Überflutung meist hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Geht die Flut jedoch zurück, führt die plötzlich hohe Verfügbarkeit von Sauerstoff und Licht zu einem rapiden Anstieg der ROS-Produktion, noch bevor die Pflanze zur zellulären Homöostase zurückkehrt (Tamang & Fukao, 2015; Yeung et al., 2019). Die dargelegten Funktionen einiger Zielgene von *AtLBD41* führen zu der Annahme, dass *AtLBD41* dazu beitragen könnte, ein ROS-Gleichgewicht nach Überflutung herzustellen. Interessanterweise fiel bei einer Analyse der GO-Kategorien auf, dass sowohl für die durch *AtLBD41*Δ*EAR:VP16* induzierten Gene als auch für die durch *WT_AtLBD41* reprimierten Gene eine signifikante Anreicherung des biologischen Prozesses Oxidations- und Reduktionsprozess festgestellt werden konnte (Tab. 3), was die Hypothese einer möglichen Funktion von *AtLBD41* im Zusammenhang mit oxidativen Stress nach Überflutung stützt.

4.2.3 AtLBD41 reguliert seine Zielgene redundant mit AtLBD40 und AtLBD42

Die meisten *loss-of-function* Mutationen einzelner Gene zeigen in Arabidopsis keine detektierbaren Phänotypen, wodurch die Analyse der Genfunktion deutlich erschwert wird (Bolle et al., 2011). Auch in der LBD-Genfamilie führten nur Mutationen einiger weniger Gene zu deutlichen Ergebnissen, und viele Erkenntnisse wurden durch *gain-of-function* Experimente oder durch Mutanten höherer Ordnung erhalten, was eine Redundanz von LBD-Mitgliedern impliziert (Oh et al., 2010; Semiarti et al., 2001; Lin et al., 2003; Nakazawa et al., 2003; Chalfun-Junior et al., 2005; Okushima et al., 2007; Soyano et al., 2008; Rubin et al., 2009).

Die 43 Mitglieder der LBD-Genfamilie aus Arabidopsis wurden anhand der Struktur der LOB Domäne in zwei Klassen unterteilt. Während die LOB-Domäne am N-Terminus hoch konserviert ist, so ist der C-Terminus der LOB-Proteine variabel (Iwakawa et al., 2002; Shuai et al., 2002; Matsumura et al., 2009). Die Klasse II besteht aus insgesamt sechs Mitgliedern. Die Dreiergruppen *AtLBD37*, *AtLBD38* und *AtLBD39* sowie *AtLBD40*, *AtLBD41* und *AtLBD42* stammen dabei jeweils von einem gemeinsamen Vorfahren ab (Kong et al., 2017). Während *AtLBD41* sich auf Chromosom drei befindet, befinden sich *AtLBD40* und *AtLBD42* in geringer genetischer Distanz auf Chromosom eins, weshalb diese womöglich durch Genduplikation entstanden sein könnten (Abb. 40).



Abb. 40 | Chromosomale Lokalisation der Klasse II LBDs aus Arabidopsis.

Die Grafik wurde mit Hilfe des *Chromosome Map Tools* von TAIR (*Tool of the Arabidopsis Information Resource*) erstellt.

Es wurde beobachtet, dass LBD-Gene ähnliche biologische Funktionen in verschiedenen Angiospermen ausüben: So kontrollieren zum Beispiel Orthologe von *AtLBD16* die Ausbildung von Lateralwurzeln in Arabidopsis, Reis und Mais (Okushima et al., 2007; Inukai et al., 2005; Taramino et al., 2007), während Orthologe von *AtLBD6* die abaxial-adaxialen Blattpolaritäten in Arabidopsis und Mais regulieren (Semiarti et al., 2001; Xu et al., 2003; Evans, 2007). Interessanterweise werden orthologe Gene des TFs LBD41 sowohl in weiteren Brassicaceae (Gasch et al., 2016) als auch in Reis (Mustroph et al., 2010) und

Mais (Locke et al., 2017) bei Hypoxie und Überflutung induziert, was eine konservierte Funktion von LBD41 bei Sauerstoffmangel impliziert.

In der Tat konnte im Rahmen der Arbeit festgestellt werden, dass transregulatorische Mechanismen von LBD41 zwischen den Spezies konserviert sind: Die Arabidopsis-Effektoren AtLBD40ΔEAR:VP16 und AtLBD41ΔEAR:VP16 waren in der Lage, die Reis-Promotoren der orthologen Zielgene *OsPGDH*, *OSPUP1.1*, *OsPUP3.1* und *OsGGT4* signifikant zu aktivieren (Abb. 32A). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Effektor OsLBD41ΔEAR:VP16 den Promotor von *OsGGT4* signifikant aktivieren konnte (Abb. 32B). Es konnten an dieser Stelle zwar keine weiteren Promotoren aus Reis identifiziert werden, die durch OsLBD41ΔEAR:VP16 reguliert wurden, jedoch wurden die Versuche mit Protoplasten aus Arabidopsis durchgeführt. Folglich sollten zukünftige Wiederholungen der Versuche mit Protoplasten, welche aus Reis gewonnen wurden, durchgeführt werden.

Für die Einzelmutante *lbd41* konnten sowohl bei Kontrollbedingungen als auch bei Hypoxie weder Phänotypen noch eine differentielle Regulation der potentiellen Zielgene beobachtet werden (Abb. 28A). Folglich wurde angenommen, dass ein Funktionsverlust von *AtLBD41* durch redundant wirkende Transkriptionsfaktoren aufgefangen wird. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass das Transkript von *AtLBD40* bei Hypoxie in *lbd41* induziert wurde (Abb. 28A). Die Expression von *AtLBD40* ist auch Hypoxie-responsiv, wohingegen für *AtLBD42* keine Induktion bei Hypoxie detektiert werden konnte (Branco-Price et al., 2008; Mustroph et al., 2009). Transaktivierungsversuche in Protoplasten zeigten, dass auch AtLBD42 neben AtLBD40 und AtLBD41 in der Lage war, in Fusion mit VP16 die Promotoren der identifizierten Zielgene zu regulieren (Abb. 29).

Mit Ausnahme von AtLBD39 wurde für alle Mitglieder der Klasse II LBDs eine C-terminale EAR-Domäne annotiert (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009). Im Rahmen der Arbeit konnte jedoch auch für AtLBD39 ein ähnliches Sequenzmotiv am C-Terminus identifiziert werden (Abb. 30A). Um auszuschließen, dass AtLBD37/38/39 ebenfalls die identifizierten Zielgene regulieren können, wurden die Effektoren AtLBD37ΔEAR:VP16 und AtLBD39ΔEAR:VP16 im Protoplastensystem getestet. Im Zuge dessen konnte festgestellt werden, dass die identifizierten Zielgene spezifisch durch AtLBD40/41/42 reguliert werden und diese Funktion nicht von anderen Mitgliedern der Klasse II LBDs übernommen werden konnte (Abb. 30).

Aufgrund der angenommenen Redundanz von AtLBD40/41/42 wurde die Dreifachmutante *lbd40/41/42* generiert (Abb. 33). Eine vorläufige Analyse der Genexpression der Zielgene *AtPUP10* und *AtLBD39* zeigte jedoch keine veränderte Expression in *lbd40/41/42* im Vergleich zum WT bei Hypoxie auf (Abb. 34). Adulte Pflanzen von *lbd40/41/42* wiesen zudem keine veränderte Toleranz gegenüber Überflutung auf (Abb. 35A). Im Keimlingsstadium konnte jedoch erstmals ein Phänotyp detektiert wer-

den. Nach Hypoxie-Stress wies die Dreifachmutante *lbd40/41/42* eine signifikant schlechtere Überlebensrate im Vergleich zum WT auf (Abb. 35). Demnach bestätigen diese Ergebnisse, dass *AtLBD40/41/42* zur Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel, zumindest nachweislich im Keimlingsstadium, beitragen.

4.2.4 AtLBD41 wird SUMOyliert

Neben einer Kontrolle der Transkription zählen posttranslationale Modifikationen zu den wichtigsten Mechanismen, welche eine dynamische Regulation der Genexpression ermöglichen. Aufgrund der zuvor beschriebenen Interaktion von AtLBD41 mit SUMO-modifizierenden Enzymen (Elrouby & Coupland, 2010) wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche SUMOylierung des Proteins untersucht. Tatsächlich konnte mittels Co-IP eine klare Interaktion von AtLBD41 mit AtSUMO1 und damit eine SUMOylierung von AtLBD41 nachgewiesen werden (Abb. 38). Für AtLBD40 konnte ebenfalls eine, wenn auch deutlich schwächere, Interaktion mit AtSUMO1 gezeigt werden (Abb. 38).

Eine posttranslationale Modifikation durch SUMO kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen. SUMO kann mit anderen posttranslationalen Modifikationen kompetieren und die Interaktion mit Proteinen verändern. So zum Beispiel inhibiert die SUMOylierung von IKB α (*inhibitor of nuclear factor kB alpha*) dessen Ubiquitinierung an einem distinkten Lysinrest und verhindert damit einen Abbau des Proteins durch das Proteasom (Desterro et al., 1998). Zudem kann SUMOylierung sich auf den Aufenthaltsort in der Zelle, die Stabilität und Aktivität von Proteinen auswirken. Auch wenn die genauen molekularen Mechanismen noch nicht verstanden sind, wurde gezeigt, dass SUMOylierung von Substraten in Reaktion vor allem auf Stressfaktoren wie Hitze, Ethanol oder Trockenheit erfolgt und interspezifisch in Arabidopsis, Drosophila und *Caenorhabditis elegans* konserviert ist (Saitoh & Hinchey, 2000; Kurepa et al., 2003; Augustine et al., 2016; Drabikowski et al., 2018; Morrell & Sadanandom, 2019). Die meisten bis dato identifizierten SUMO-Substrate aus Arabidopsis sind im Nukleus lokalisiert und stellen im Wesentlichen Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren/-Repressoren und Chromatin-modifizierende Proteine dar, die mit biotischen und abiotischen Stressantworten in Verbindung gebracht wurden (Rytz et al., 2018; Morrell & Sadanandom, 2019). So wurde zum Beispiel eine SUMOylierung der TFs *PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1 (PHR1)*, *INDUCER OF CBF EXPRESSION1 (ICE1)* und *heat shock factor A2 (HSFA2)* mit der Toleranz gegenüber Phosphatmangel, extremer Kälte und Hitze assoziiert (Miura et al., 2005; Miura et al., 2007b; Cohen-Peer et al., 2010).

Die Rolle von SUMOylierung wurde im Zusammenhang mit Überflutung und Sauerstoffmangel bislang nicht adressiert. AtLBD41 besitzt mehrere mögliche SUMOylierungsstellen (Abb. 37). Da ein Motiv in der DNA-Bindedomäne von AtLBD41 lokalisiert wurde und zudem in dem Reis-Orthologen OsLBD41

konserviert ist, könnte SUMOylierung an dieser Stelle die Bindung an die Promotoren der Zielgene beeinflussen. Interessanterweise führte ein Austausch des für die SUMOylierung essentiellen Lysins zu einem Arginin an dieser Stelle zu einem Stabilitätsverlust des Proteins, womit keine SUMOylierung mehr nachweisbar war, was die Wichtigkeit dieser SUMOylierungsstelle annehmen lässt (Abb. 38). Ein weiteres Motiv liegt in unmittelbarer Nähe zur EAR-Domäne und könnte daher die Interaktion mit dem Co-Repressor TPL beeinträchtigen. Eine SUMOylierung an beiden Stellen hätte in der Theorie zur Folge, dass die Repressorfunktion von AtLBD41 unterdrückt wird und Zielgene verstärkt transkribiert werden können. Da die Zielgene von AtLBD41 bei Sauerstoffmangel reprimiert werden und bei Wiederbelüftung induziert werden, würde das bedeuten, dass SUMOylierung von AtLBD41 eventuell durch Wiederbelüftung/oxidativen Stress stattfindet und bei Hypoxie abnimmt. Auch wenn *AtLBD41* einer starken transkriptionellen Kontrolle unterliegt, könnte SUMOylierung eine weitere Kontrollinstanz darstellen, welche eine dynamische Regulation der Genexpression bei fluktuierenden Sauerstoffkonzentrationen ermöglicht. Hier wäre es für zukünftige Versuche von großem Interesse, weitere SUMOylierungsstellen zu mutieren und deren Einfluss auf die Stabilität des SUMOylierungsstatus' zu untersuchen.

4.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurde *AtERF#111* als verwundungsresponsiver TF identifiziert, dessen Expression ebenfalls durch Hypoxie und Überflutung induziert wird. Für *AtERF#111* konnte weder ein Zusammenhang zur ABA-Signalgebung noch zur Antwort auf Trockenstress ermittelt werden. Obwohl *AtERF#111* mit den Aminosäuren Methionin und Cystein am N-Terminus initiiert, wird die Stabilität des Proteins nicht durch den *Arg/N-degron pathway* reguliert, hängt jedoch dennoch vom Ubiquitin/Proteasom System ab. Mittels Mikroarrayanalysen konnten *AtERF#111*-Zielgene identifiziert werden, welche direkt durch den TF aktiviert werden und in Zusammenhang mit der Verwundungsantwort stehen. Zukünftig gilt es zu klären, welche Funktion *AtERF#111* als möglicher Mediator der Überflutungs- und Verwundungsantwort einnimmt. Aufgrund der angenommenen Redundanz von *AtERF#111* und anderen GXERFs ist es sinnvoll, Mutanten höherer Ordnung zur weiteren Aufklärung der Wirkungsweise zu generieren.

Die Funktion von *AtLBD41* als potentieller Repressor der Transkription bei Sauerstoffmangel war bislang völlig unklar. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, potentielle Zielgene des TFs zu identifizieren, welche bei Sauerstoffmangel reprimiert werden. Es wurde festgestellt, dass *AtLBD41* seine Zielgene redundant mit *AtLBD40* und *AtLBD42* regulieren kann. Die Dreifachmutante *lbd40/lbd41/lbd42* wies eine signifikant schlechtere Überlebensrate bei Hypoxie im Vergleich zum Wildtyp auf. Die identifizierten Zielgene besitzen keine eindeutige Funktion in Bezug zu Sauerstoffmangel, könnten jedoch im Zusammenhang mit der Rückkehr zur zellulären Homöostase nach Überflutung stehen. Für die Zukunft empfiehlt sich eine umfassende Analyse der Genexpression der Mutante *lbd40/lbd41/lbd42* sowie eine weitere Bestätigung der Zielgene. Hierfür könnten auch die in der Arbeit generierten stabilen *LBD41*-OE Linien herangezogen werden, zum Beispiel im Rahmen von ChIP-Seq Analysen. Die stabilen *AtLBD41ΔEAR:VP16* Linien könnten zudem für weitere Expressions- sowie Phänotyp-Analysen verwendet werden. Viele Publikationen der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine Fusion mit VP16 transkriptionelle Repressoren aus *Arabidopsis* in Aktivatoren umfunktionieren kann, welche einen ähnlichen oder sogar stärkeren Phänotyp als die korrespondierenden Null-Allel-Mutanten hervorrufen (Koo et al., 2010; Hanano & Goto, 2011; Chen et al., 2011; Shih et al., 2013; Fujiwara et al., 2014). Zuletzt konnte demonstriert werden, dass *AtLBD41* posttranslational durch SUMOylierung modifiziert wird. Gegenstand zukünftiger Forschung wird sein, inwiefern SUMOylierung in Abhängigkeit von Sauerstoffmangel und Wiederbelüftung reguliert wird und welche Auswirkungen die Modifikation auf Proteinlokalisierung, Protein-Protein Interaktion und die transkriptionelle Aktivität von *AtLBD41* hat.

5 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* **15** (1): 63–78.
- Abeles, F.B., Saltveit, M.E., and Morgan, P.W.** (1992). *Ethylene in Plant Biology* (San Diego: Academic Press).
- Abiko, T., Kotula, L., Shiono, K., Malik, A.I., Colmer, T.D., and Nakazono, M.** (2012). Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Plant, Cell & Environment* **35** (9): 1618–1630.
- Albinsky, D., Kusano, M., Higuchi, M., Hayashi, N., Kobayashi, M., Fukushima, A., Mori, M., Ichikawa, T., Matsui, K., Kuroda, H., Horii, Y., Tsumoto, Y., Sakakibara, H., Hirochika, H., Matsui, M., and Saito, K.** (2010). Metabolomic screening applied to rice FOX *Arabidopsis* lines leads to the identification of a gene-changing nitrogen metabolism. *Molecular Plant* **3** (1): 125–142.
- Alfieri, L., Bisselink, B., Dottori, F., Naumann, G., de Roo, A., Salamon, P., Wyser, K., and Feyen, L.** (2017). Global projections of river flood risk in a warmer world. *Earth's Future* **5** (2): 171–182.
- Armstrong, W.** (1980). Aeration in Higher Plants. In *Advances in Botanical Research Volume 7* (Elsevier): 225–332.
- Augustine, R.C., York, S.L., Rytz, T.C., and Vierstra, R.D.** (2016). Defining the SUMO System in Maize: SUMOylation Is Up-Regulated during Endosperm Development and Rapidly Induced by Stress. *Plant Physiol.* **171** (3): 2191–2210.
- Bailey-Serres, J., and Colmer, T.D.** (2014). Plant tolerance of flooding stress—recent advances. *Plant, Cell & Environment* **37** (10): 2211–2215.
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., Lee, S.C., Licausi, F., Perata, P., Voesenek, L.A.C.J., and van Dongen, J.T.** (2012). Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science* **17** (3): 129–138.
- Bailey-Serres, J., Fukao, T., Ronald, P., Ismail, A., Heuer, S., and Mackill, D.** (2010). Submergence Tolerant Rice: SUB1's Journey from Landrace to Modern Cultivar. *Rice* **3** (2-3): 138–147.
- Bailey-Serres, J., and Voesenek, L.A.C.J.** (2008). Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 313–339.
- Barding, G.A., Béni, S., Fukao, T., Bailey-Serres, J., and Larive, C.K.** (2013). Comparison of GC-MS and NMR for metabolite profiling of rice subjected to submergence stress. *Journal of Proteome Research* **12** (2): 898–909.
- Bendall, D.S., Howe, C.J., Nisbet, E.G., and Nisbet, R.E.R.** (2008). Photosynthetic and atmospheric evolution. Introduction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **363** (1504): 2625–2628.
- Benlloch, R., and Lois, L.M.** (2018). Sumoylation in plants: mechanistic insights and its role in drought stress. *Journal of Experimental Botany* **69** (19): 4539–4554.

- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J., and Parcy, F.** (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters* **561** (1-3): 127–131.
- Benstein, R.M., Ludewig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Gierth, M., Flügge, U.-I., and Krueger, S.** (2013). *Arabidopsis* phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *The Plant Cell* **25** (12): 5011–5029.
- Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., Moura, D.S. de, and Ryan, C.A.** (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (4): 1756–1760.
- Bernard, P., and Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226** (3): 735–745.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., and Lima, C.D.** (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108** (3): 345–356.
- Bhargava, A., Clabaugh, I., To, J.P., Maxwell, B.B., Chiang, Y.-H., Schaller, G.E., Loraine, A., and Kieber, J.J.** (2013). Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **162** (1): 272–294.
- Birkenbihl, R.P., Kracher, B., and Somssich, I.E.** (2017). Induced Genome-Wide Binding of Three *Arabidopsis* WRKY Transcription Factors during Early MAMP-Triggered Immunity. *The Plant Cell* **29** (1): 20–38.
- Blom, C.W.P.M., and Voeselek, L.A.C.J.** (1996). Flooding: the survival strategies of plants. *Trends in Ecology & Evolution* **11** (7): 290–295.
- Bolle, C., Schneider, A., and Leister, D.** (2011). Perspectives on Systematic Analyses of Gene Function in *Arabidopsis thaliana*: New Tools, Topics and Trends. *Current Genomics* **12** (1): 1–14.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* **12** (12): 2383–2394.
- Bouquin, T., Lasserre, E., Pradier, J., Pech, J.C., and Balagué, C.** (1997). Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene *CM-ACO1* occurs via two direct and independent transduction pathways. *Plant Molecular Biology* **35** (6): 1029–1035.
- Branco-Price, C., Kaiser, K.A., Jang, C.J.H., Larive, C.K., and Bailey-Serres, J.** (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56** (5): 743–755.
- Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R.B., and Bailey-Serres, J.** (2005). Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Annals of Botany* **96** (4): 647–660.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P., and Osborn, R.W.** (1995). Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108** (4): 1353–1358.
- Bruick, R.K., and McKnight, S.L.** (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294** (5545): 1337–1340.

- Bui, L.T., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., and Licausi, F.** (2015). Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **236**: 37–43.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., and Frommer, W.B.** (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34** (1): 13–26.
- Busk, P.K., and Pagès, M.** (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology* **37** (3): 425–435.
- Cai, X.-T., Xu, P., Zhao, P.-X., Liu, R., Yu, L.-H., and Xiang, C.-B.** (2014). *Arabidopsis* ERF109 mediates cross-talk between jasmonic acid and auxin biosynthesis during lateral root formation. *Nature Communications* **5**: 5833.
- Campbell, M.T., Proctor, C.A., Dou, Y., Schmitz, A.J., Phansak, P., Kruger, G.R., Zhang, C., and Walia, H.** (2015). Genetic and molecular characterization of submergence response identifies *Sub1a6* as a major submergence tolerance locus in maize. *PloS ONE* **10** (3): e0120385.
- Castaño-Miquel, L., Seguí, J., and Lois, L.M.** (2011). Distinctive properties of *Arabidopsis* SUMO paralogues support the in vivo predominant role of AtSUMO1/2 isoforms. *The Biochemical Journal* **436** (3): 581–590.
- Castro, P.H., Tavares, R.M., Bejarano, E.R., and Azevedo, H.** (2012). SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **69** (19): 3269–3283.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., and Davies, B.** (2012). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **158** (1): 423–438.
- Çevik, V., Kidd, B.N., Zhang, P., Hill, C., Kiddle, S., Denby, K.J., Holub, E.B., Cahill, D.M., Manners, J.M., Schenk, P.M., Beynon, J., and Kazan, K.** (2012). MEDIATOR25 acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **160** (1): 541–555.
- Chalfun-Junior, A., Franken, J., Mes, J.J., Marsch-Martinez, N., Pereira, A., and Angenent, G.C.** (2005). *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE1* gene, a member of the AS2/LOB family, controls proximal-distal patterning in *Arabidopsis* petals. *Plant Molecular Biology* **57** (4): 559–575.
- Chandler, J.W.** (2018). Class VIIIb APETALA2 Ethylene Response Factors in Plant Development. *Trends in Plant Science* **23** (2): 151–162.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., and Gao, C.** (2019). CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology* **70**: 667–697.
- Chen, M.-K., Hsu, W.-H., Lee, P.-F., Thiruvengadam, M., Chen, H.-I., and Yang, C.-H.** (2011). The MADS box gene, FOREVER YOUNG FLOWER, acts as a repressor controlling floral organ senescence and abscission in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **68** (1): 168–185.
- Chen, R., Jiang, H., Li, L., Zhai, Q., Qi, L., Zhou, W., Liu, X., Li, H., Zheng, W., Sun, J., and Li, C.** (2012). The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *The Plant Cell* **24** (7): 2898–2916.

- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448** (7154): 666–671.
- Cho, H.-T., and Cosgrove, D.J.** (2002). Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14** (12): 3237–3253.
- Choi, D., Cho, H.-T., and Lee, Y.** (2006). Expansins: Expanding importance in plant growth and development. *Physiol Plant* **126**: 511–518.
- Choy, M.-K., Sullivan, J.A., Theobald, J.C., Davies, W.J., and Gray, J.C.** (2008). An *Arabidopsis* mutant able to green after extended dark periods shows decreased transcripts of seed protein genes and altered sensitivity to abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **59** (14): 3869–3884.
- Clifton, R., Millar, A.H., and Whelan, J.** (2006). Alternative oxidases in *Arabidopsis*: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757** (7): 730–741.
- Cohen-Peer, R., Schuster, S., Meiri, D., Breiman, A., and Aveni, A.** (2010). Sumoylation of *Arabidopsis* heat shock factor A2 (HsfA2) modifies its activity during acquired thermotolerance. *Plant Molecular Biology* **74** (1-2): 33–45.
- Colby, T., Matthäi, A., Boeckelmann, A., and Stuible, H.-P.** (2006). SUMO-conjugating and SUMO-deconjugating enzymes from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **142** (1): 318–332.
- Colmer, T.D.** (2003). Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant, Cell & Environment* **26** (1): 17–36.
- Colmer, T.D., and Voesenek, L.A.C.J.** (2009). Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biol.* **36** (8): 665.
- Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H.K., Jenkins, G.I., and Tonelli, C.** (2008). Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **165** (8): 886–894.
- Cosgrove, D.J.** (2000). Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407** (6802): 321–326.
- Cox, M.C.H., Millenaar, F.F., van Berkel, Y.E.M.d.J., Peeters, A.J.M., and Voesenek, L.A.C.J.** (2003). Plant movement. Submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris* depends on hyponastic growth. *Plant Physiol.* **132** (1): 282–291.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R.** (2010). Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 651–679.
- Dar, M.H., Janvry, A. de, Emerick, K., Raitzer, D., and Sadoulet, E.** (2013). Flood-tolerant rice reduces yield variability and raises expected yield, differentially benefitting socially disadvantaged groups. *Sci Rep* **3**.
- Davies, D.D.** (1980). Anaerobic Metabolism and the Production of Organic Acids. In *Metabolism and Respiration* (Elsevier), pp. 581–611.
- Davies, D.D., Grego, S., and Kenworthy, P.** (1974). The control of the production of lactate and ethanol by higher plants. *Planta* **118** (4): 297–310.

- de Beer, A., and Vivier, M.A.** (2011). Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research Notes* **4**: 459.
- Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E., and Köhler, M.** (2008). Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783** (3): 394–404.
- Desterro, J.M.P., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T.** (1998). SUMO-1 Modification of I κ B α Inhibits NF- κ B Activation. *Molecular Cell* **2** (2): 233–239.
- Dietz, K.-J., Vogel, M.O., and Viehhauser, A.** (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* **245** (1-4): 3–14.
- Dissmeyer, N.** (2019). Conditional Protein Function via N-Degron Pathway-Mediated Proteostasis in Stress Physiology. *Annual Review of Plant Biology* **70**: 83–117.
- Dissmeyer, N., Rivas, S., and Graciet, E.** (2018). Life and death of proteins after protease cleavage: protein degradation by the N-end rule pathway. *The New Phytologist* **218** (3): 929–935.
- Dohmen, R.J.** (2004). SUMO protein modification. *Biochimica et Biophysica Acta* **1695** (1-3): 113–131.
- Dolan, L., Duckett, C.M., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Poethig, S., and Roberts, K.** (1994). Clonal relationships and cell patterning of the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* (120): 2465–2474.
- Drabikowski, K., Ferralli, J., Kistowski, M., Oledzki, J., Dadlez, M., and Chiquet-Ehrismann, R.** (2018). Comprehensive list of SUMO targets in *Caenorhabditis elegans* and its implication for evolutionary conservation of SUMO signaling. *Scientific Reports* **8** (1): 1139.
- Drew, M.C.** (1997). OXYGEN DEFICIENCY AND ROOT METABOLISM: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 223–250.
- Drew, M.C., He, C.J., and Morgan, P.W.** (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* **5** (3): 123–127.
- Drew, M.C., and Lynch, J.M.** (1980). Soil Anaerobiosis, Microorganisms, and Root Function. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18** (1): 37–66.
- Elrouby, N.** (2017). Regulation of Plant Cellular and Organismal Development by SUMO. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **963**: 227–247.
- Elrouby, N., and Coupland, G.** (2010). Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** (40): 17415–17420.
- Epstein, A.C.R., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.-M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J.** (2001). *C. elegans* EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* **107** (1): 43–54.
- Evans, M.M.S.** (2007). The indeterminate gametophyte1 gene of maize encodes a LOB domain protein required for embryo Sac and leaf development. *The Plant Cell* **19** (1): 46–62.

- Eysholdt-Derzsó, E., and Sauter, M.** (2017). Root Bending Is Antagonistically Affected by Hypoxia and ERF-Mediated Transcription via Auxin Signaling. *Plant Physiol.* **175** (1): 412–423.
- Eysholdt-Derzsó, E., and Sauter, M.** (2019). Hypoxia and the group VII ethylene response transcription factor HRE2 promote adventitious root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Biology* **21 Suppl 1**: 103–108.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G.** (2006). Seed dormancy and the control of germination. *The New Phytologist* **171** (3): 501–523.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., and Rock, C.D.** (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell* **14** (suppl 1): S15–S45.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations** (2017). The impact of disasters and crises on agriculture and food security, 2017 (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Foyer, C.H., and Noctor, G.** (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* **155** (1): 2–18.
- Fujiwara, S., Kigoshi, K., Mitsuda, N., Suzuki, K., and Ohme-Takagi, M.** (2014). VP16 fusion efficiently reveals the function of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* **31** (2): 123–132.
- Fukao, T., and Bailey-Serres, J.** (2004). Plant responses to hypoxia--is survival a balancing act? *Trends in Plant Science* **9** (9): 449–456.
- Fukao, T., and Bailey-Serres, J.** (2008). Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLR1.1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (43): 16814–16819.
- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B.E., Juntawong, P., and Peña-Castro, J.M.** (2019). Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. *Front. Plant Sci.* **10**: 308.
- Fukao, T., Xu, K., Ronald, P.C., and Bailey-Serres, J.** (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell* **18** (8): 2021–2034.
- Fukao, T., Yeung, E., and Bailey-Serres, J.** (2011). The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *The Plant Cell* **23** (1): 412–427.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., and Rodríguez-Palenzuela, P.** (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* **47** (6): 479–491.
- Gasch, P., Funderinger, M., Müller, J.T., Lee, T., Bailey-Serres, J., and Mustroph, A.** (2016). Redundant ERF-VII Transcription Factors Bind to an Evolutionarily Conserved cis-Motif to Regulate Hypoxia-Responsive Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **28** (1): 160–180.
- Geigenberger, P.** (2003). Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* **6** (3): 247–256.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., and Jacquot, J.P.** (2005). The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **62** (1): 24–35.

- Gibbs, D.J., Bailey, M., Tedds, H.M., and Holdsworth, M.J.** (2016). From start to finish: Amino-terminal protein modifications as degradation signals in plants. *The New Phytologist* **211** (4): 1188–1194.
- Gibbs, D.J., Conde, J.V., Berckhan, S., Prasad, G., Mendiondo, G.M., and Holdsworth, M.J.** (2015). Group VII Ethylene Response Factors Coordinate Oxygen and Nitric Oxide Signal Transduction and Stress Responses in Plants. *Plant Physiol.* **169** (1): 23–31.
- Gibbs, D.J., and Holdsworth, M.J.** (2020). Every Breath You Take: New Insights into Plant and Animal Oxygen Sensing. *Cell* **180** (1): 22–24.
- Gibbs, D.J., Lee, S.C., Isa, N.M., Gramuglia, S., Fukao, T., Bassel, G.W., Correia, C.S., Corbineau, F., Theodoulou, F.L., Bailey-Serres, J., and Holdsworth, M.J.** (2011). Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479** (7373): 415–418.
- Gibbs, D.J., Md Isa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G.M., Berckhan, S., La Marín-de Rosa, N., Vicente Conde, J., Sousa Correia, C., Pearce, S.P., Bassel, G.W., Hamali, B., Talloji, P., Tomé, D.F.A., Coego, A., Beynon, J., Alabadí, D., Bachmair, A., León, J., Gray, J.E., Theodoulou, F.L., and Holdsworth, M.J.** (2014). Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Molecular Cell* **53** (3): 369–379.
- Gibbs, D.J., Tedds, H.M., Labandera, A.-M., Bailey, M., White, M.D., Hartman, S., Sprigg, C., Mogg, S.L., Osborne, R., Dambire, C., Boeckx, T., Paling, Z., Voesenek, L.A.C.J., Flashman, E., and Holdsworth, M.J.** (2018). Oxygen-dependent proteolysis regulates the stability of angiosperm polycomb repressive complex 2 subunit VERNALIZATION 2. *Nature Communications* **9** (1): 5438.
- Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B., and Frommer, W.B.** (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12** (2): 291–300.
- Giuntoli, B., Lee, S.C., Licausi, F., Kosmacz, M., Oosumi, T., van Dongen, J.T., Bailey-Serres, J., and Perata, P.** (2014). A trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in *Arabidopsis*. *PLoS biology* **12** (9): e1001950.
- Giuntoli, B., Licausi, F., van Veen, H., and Perata, P.** (2017). Functional balancing of the hypoxia regulators RAP2.12 and HRA1 takes place in vivo in *Arabidopsis thaliana* plants. *Frontiers in Plant Science* **8**: 591.
- Goossens, J., Swinnen, G., Vanden Bossche, R., Pauwels, L., and Goossens, A.** (2015). Change of a conserved amino acid in the MYC2 and MYC3 transcription factors leads to release of JAZ repression and increased activity. *The New Phytologist* **206** (4): 1229–1237.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del Sal, G.** (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *The EMBO Journal* **18** (22): 6462–6471.
- Graciet, E., Walter, F., Ó'Maoiléidigh, D.S., Pollmann, S., Meyerowitz, E.M., Varshavsky, A., and Wellmer, F.** (2009). The N-end rule pathway controls multiple functions during *Arabidopsis* shoot and leaf development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (32): 13618–13623.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** (12): 4645–4649.

- Greenway, H., and Gibbs, J.** (2003). Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Functional Plant Biol.* **30** (10): 999.
- Greve, T.M., Borum, J., and Pedersen, O.** (2003). Meristematic oxygen variability in eelgrass (*Zostera marina*). *Limnol. Oceanogr.* **48** (1): 210–216.
- Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R., and Meyer, A.J.** (2007). gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **581** (17): 3131–3138.
- Guglielminetti, L., Perata, P., and Alpi, A.** (1995). Effect of Anoxia on Carbohydrate Metabolism in Rice Seedlings. *Plant Physiol.* **108** (2): 735–741.
- Ha, C.V., Leyva-González, M.A., Osakabe, Y., Tran, U.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi, S., van Dong, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., and Tran, L.-S.P.** (2014). Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111** (2): 851–856.
- Hammoudi, V., Vlachakis, G., Schranz, M.E., and van den Burg, H.A.** (2016). Whole-genome duplications followed by tandem duplications drive diversification of the protein modifier SUMO in Angiosperms. *The New Phytologist* **211** (1): 172–185.
- Hanano, S., and Goto, K.** (2011). *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *The Plant Cell* **23** (9): 3172–3184.
- Hartman, S., Liu, Z., van Veen, H., Vicente, J., Reinen, E., Martopawiro, S., Zhang, H., van Dongen, N., Bosman, F., Bassel, G.W., Visser, E.J.W., Bailey-Serres, J., Theodoulou, F.L., Hebelstrup, K.H., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., Sasidharan, R., and Voesenek, L.A.C.J.** (2019). Ethylene-mediated nitric oxide depletion pre-adapts plants to hypoxia stress. *Nature Communications* **10** (1): 4020.
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X.-J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H., and Ashikari, M.** (2009). The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460** (7258): 1026–1030.
- Häusler, R.E., Ludewig, F., and Krueger, S.** (2014). Amino acids—a life between metabolism and signaling. *Plant Science* **229**: 225–237.
- Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I.** (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of Biological Chemistry* **281** (23): 16117–16127.
- Heyman, J., Canher, B., Bisht, A., Christiaens, F., and Veylder, L. de** (2018). Emerging role of the plant ERF transcription factors in coordinating wound defense responses and repair. *Journal of Cell Science* **131** (2).
- Heyman, J., Cools, T., Canher, B., Shavialenka, S., Traas, J., Vercauteren, I., van den Daele, H., Persiau, G., Jaeger, G. de, Sugimoto, K., and Veylder, L. de** (2016). The heterodimeric transcription factor complex ERF115-PAT1 grants regeneration competence. *Nature Plants* **2** (11): 16165.
- Heyman, J., Cools, T., Vandenbussche, F., Heyndrickx, K.S., van Leene, J., Vercauteren, I., Vanderauwera, S., Vandepoele, K., Jaeger, G. de, van der Straeten, D., and Veylder, L. de**

- (2013). ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* **342** (6160): 860–863.
- Hill, K., Wang, H., and Perry, S.E.** (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *The Plant Journal* **53** (1): 172–185.
- Hinz, M., Wilson, I.W., Yang, J., Buerstenbinder, K., Llewellyn, D., Dennis, E.S., Sauter, M., and Dolferus, R.** (2010). *Arabidopsis* RAP2.2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol.* **153** (2): 757–772.
- Hirabayashi, Y., Kanae, S., Emori, S., Oki, T., and Kimoto, M.** (2008). Global projections of changing risks of floods and droughts in a changing climate. *Hydrological Sciences Journal* **53** (4): 754–772.
- Hirabayashi, Y., Mahendran, R., Koirala, S., Konoshima, L., Yamazaki, D., Watanabe, S., Kim, H., and Kanae, S.** (2013). Global flood risk under climate change. *Nature Climate Change* **3** (9): 816–821.
- Ho, C.L., and Saito, K.** (2001). Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **20** (3): 243–259.
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L., and Soppe, W.J.J.** (2008). Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *The New Phytologist* **179** (1): 33–54.
- Holman, T.J., Jones, P.D., Russell, L., Medhurst, A., Ubeda Tomás, S., Talloji, P., Marquez, J., Schmutz, H., Tung, S.-A., Taylor, I., Footitt, S., Bachmair, A., Theodoulou, F.L., and Holdsworth, M.J.** (2009). The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (11): 4549–4554.
- Hsu, F.-C., Chou, M.-Y., Chou, S.-J., Li, Y.-R., Peng, H.-P., and Shih, M.-C.** (2013). Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25** (7): 2699–2713.
- Huang, S., Colmer, T.D., and Millar, A.H.** (2008). Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPI? *Trends in Plant Science* **13** (5): 221–227.
- Ikeda, M., and Ohme-Takagi, M.** (2009). A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **50** (5): 970–975.
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Heyman, J., Watanabe, S., Seo, M., Veylder, L. de, Sakakibara, H., and Sugimoto, K.** (2017). Wounding Triggers Callus Formation via Dynamic Hormonal and Transcriptional Changes. *Plant Physiol.* **175** (3): 1158–1174.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M.** (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *The Plant Cell* **17** (5): 1387–1396.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G.** (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292** (5516): 464–468.
- Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H., Semiarti, E., Machida, Y., and Machida, C.** (2007). Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of

- Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *The Plant Journal* **51** (2): 173–184.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., and Machida, Y.** (2002). The *ASYMMETRIC LEAVES2* Gene of *Arabidopsis thaliana*, Required for Formation of a Symmetric Flat Leaf Lamina, Encodes a Member of a Novel Family of Proteins Characterized by Cysteine Repeats and a Leucine Zipper. *Plant and Cell Physiology* **43** (5): 467–478.
- Jackson, M.B.** (1985). Ethylene and Responses of Plants to Soil Waterlogging and Submergence. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **36** (1): 145–174.
- Justin, S.H.F.W., and Armstrong, W.** (1987). The Anatomical Characteristics of Roots and Plant Response to Soil Flooding. *New Phytologist* **106** (3): 465–495.
- Juszczuk, I.M., and Rychter, A.M.** (2003). Alternative oxidase in higher plants. *Acta biochimica Polonica* **50** (4): 1257–1271.
- Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J.** (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* **30** (4): 393–402.
- Kagale, S., Links, M.G., and Rozwadowski, K.** (2010). Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **152** (3): 1109–1134.
- Kagale, S., and Rozwadowski, K.** (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* **6** (2): 141–146.
- Kato-Noguchi, H.** (2006). Pyruvate metabolism in rice coleoptiles under anaerobiosis. *Plant Growth Regul* **50** (1): 41–46.
- Ke, J., Ma, H., Gu, X., Thelen, A., Brunzelle, J.S., Li, J., Xu, H.E., and Melcher, K.** (2015). Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors. *Science Advances* **1** (6): e1500107.
- Kende, van der Knaap, E., and Cho** (1998). Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.* **118** (4): 1105–1110.
- Kerscher, O.** (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Reports* **8** (6): 550–555.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M.** (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**: 159–180.
- Koncz, C., Kreuzaler, F., Kalman, Z., and Schell, J.** (1984). A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *The EMBO Journal* **3** (5): 1029–1037.
- Kong, Y., Xu, P., Jing, X., Chen, L., Li, L., and Li, X.** (2017). Decipher the ancestry of the plant-specific LBD gene family. *BMC genomics* **18** (Suppl 1): 951.
- Koo, S.C., Bracko, O., Park, M.S., Schwab, R., Chun, H.J., Park, K.M., Seo, J.S., Grbic, V., Balasubramanian, S., Schmid, M., Godard, F., Yun, D.-J., Lee, S.Y., Cho, M.J., Weigel, D., and Kim, M.C.** (2010). Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box Gene AGAMOUS-LIKE6. *The Plant Journal* **62** (5): 807–816.

- Kosmacz, M., Parlanti, S., Schwarzländer, M., Kragler, F., Licausi, F., and van Dongen, J.T.** (2015). The stability and nuclear localization of the transcription factor RAP2.12 are dynamically regulated by oxygen concentration. *Plant, Cell & Environment* **38** (6): 1094–1103.
- Krogan, N.T., Hogan, K., and Long, J.A.** (2012). APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development* **139** (22): 4180–4190.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.-Y., and Vierstra, R.D.** (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *The Journal of Biological Chemistry* **278** (9): 6862–6872.
- Kurokawa, Y., Nagai, K., Huan, P.D., Shimazaki, K., Qu, H., Mori, Y., Toda, Y., Kuroha, T., Hayashi, N., Aiga, S., Itoh, J.-I., Yoshimura, A., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Shimojima, M., Malik, A.I., Pedersen, O., Colmer, T.D., and Ashikari, M.** (2018). Rice leaf hydrophobicity and gas films are conferred by a wax synthesis gene (*LGF1*) and contribute to flood tolerance. *The New Phytologist* **218** (4): 1558–1569.
- Kwon, Y.T., Kashina, A.S., Davydov, I.V., Hu, R.-G., An, J.Y., Seo, J.W., Du, F., and Varshavsky, A.** (2002). An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* **297** (5578): 96–99.
- Lacerda, A.F., Vasconcelos, E.A.R., Pelegrini, P.B., and Grossi de Sa, M.F.** (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology* **5**: 116.
- Laloi, C., Mestres-Ortega, D., Marco, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J.-P.** (2004). The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* **134** (3): 1006–1016.
- Lee, S.C., Muroph, A., Sasidharan, R., Vashisht, D., Pedersen, O., Oosumi, T., Voeselek, L.A.C.J., and Bailey-Serres, J.** (2011). Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *The New Phytologist* **190** (2): 457–471.
- Lee, S.-Y., Hwang, E.Y., Seok, H.-Y., Tarte, V.N., Jeong, M.S., Jang, S.B., and Moon, Y.-H.** (2015). *Arabidopsis* AtERF71/HRE2 functions as transcriptional activator via cis-acting GCC box or DRE/CRT element and is involved in root development through regulation of root cell expansion. *Plant Cell Reports* **34** (2): 223–231.
- Lee, T.A., and Bailey-Serres, J.** (2019). Integrative analysis from the epigenome to transcriptome uncovers patterns of dominant nuclear regulation during transient stress. *The Plant Cell*.
- León, J., Rojo, E., and Sánchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52** (354): 1–9.
- Li, J.-F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M., and Sheen, J.** (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology* **31** (8): 688–691.
- Li, X., Chen, L., Forde, B.G., and Davies, W.J.** (2017). The Biphasic Root Growth Response to Abscisic Acid in *Arabidopsis* Involves Interaction with Ethylene and Auxin Signalling Pathways. *Frontiers in Plant Science* **8**.

- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D.A., Giuntoli, B., Giorgi, F.M., Voesenek, L.A.C.J., Perata, P., and van Dongen, J.T. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479** (7373): 419–422.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., and Perata, P. (2013). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist* **199** (3): 639–649.
- Lin, C.-C., Chao, Y.-T., Chen, W.-C., Ho, H.-Y., Chou, M.-Y., Li, Y.-R., Wu, Y.-L., Yang, H.-A., Hsieh, H., Lin, C.-S., Wu, F.-H., Chou, S.-J., Jen, H.-C., Huang, Y.-H., Irene, D., Wu, W.-J., Wu, J.-L., Gibbs, D.J., Ho, M.-C., and Shih, M.-C. (2019). Regulatory cascade involving transcriptional and N-end rule pathways in rice under submergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116** (8): 3300–3309.
- Lin, W.-c., Shuai, B., and Springer, P.S. (2003). The Arabidopsis *LATERAL ORGAN BOUNDARIES*-domain gene *ASYMMETRIC LEAVES2* functions in the repression of *KNOX* gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *The Plant Cell* **15** (10): 2241–2252.
- Liu, Y., Ji, X., Zheng, L., Nie, X., and Wang, Y. (2013). Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* **14** (5): 9979–9998.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25** (4): 402–408.
- Locke, A.M., Barding, G.A., Sathnur, S., Larive, C.K., and Bailey-Serres, J. (2017). Rice SUB1A constrains remodelling of the transcriptome and metabolome during submergence to facilitate post-submergence recovery. *Plant, Cell & Environment*.
- Lokdarshi, A., Conner, W.C., McClintock, C., Li, T., and Roberts, D.M. (2016). *Arabidopsis* CML38, a Calcium Sensor That Localizes to Ribonucleoprotein Complexes under Hypoxia Stress. *Plant Physiol.* **170** (2): 1046–1059.
- Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R., and Meyerowitz, E.M. (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* **312** (5779): 1520–1523.
- Long, J.A., Woody, S., Poethig, S., Meyerowitz, E.M., and Barton, M.K. (2002). Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the TOPLESS locus. *Development* **129** (12): 2797–2806.
- Lorang, J., Kidarsa, T., Bradford, C.S., Gilbert, B., Curtis, M., Tzeng, S.-C., Maier, C.S., and Wolpert, T.J. (2012). Tricking the guard: Exploiting plant defense for disease susceptibility. *Science* **338** (6107): 659–662.
- Luhua, S., Hegie, A., Suzuki, N., Shulaev, E., Luo, X., Cenariu, D., Ma, V., Kao, S., Lim, J., Gunay, M.B., Oosumi, T., Lee, S.C., Harper, J., Cushman, J., Gollery, M., Girke, T., Bailey-Serres, J., Stevenson, R.A., Zhu, J.-K., and Mittler, R. (2013). Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiologia Plantarum* **148** (3): 322–333.
- Luo, X., Chen, Z., Gao, J., and Gong, Z. (2014). Abscisic acid inhibits root growth in *Arabidopsis* through ethylene biosynthesis. *The Plant Journal* **79** (1): 44–55.
- Lyons, T.W., Reinhard, C.T., and Planavsky, N.J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature* **506**: 307 EP -.

- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324** (5930): 1064–1068.
- Maffei, M.E., Mithöfer, A., and Boland, W.** (2007). Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends in Plant Science* **12** (7): 310–316.
- Magneschi, L., and Perata, P.** (2009). Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. *Annals of Botany* **103** (2): 181–196.
- Majer, C., and Hochholdinger, F.** (2011). Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins. *Trends in Plant Science* **16** (1): 47–52.
- Marchi, R. de, Sorel, M., Mooney, B., Fudal, I., Goslin, K., Kwaśniewska, K., Ryan, P.T., Pfalz, M., Kroymann, J., Pollmann, S., Feechan, A., Wellmer, F., Rivas, S., and Graciet, E.** (2016). The N-end rule pathway regulates pathogen responses in plants. *Scientific Reports* **6**: 26020.
- Martin-Arevalillo, R., Nanao, M.H., Larrieu, A., Vinos-Poyo, T., Mast, D., Galvan-Ampudia, C., Brunoud, G., Vernoux, T., Dumas, R., and Parcy, F.** (2017). Structure of the *Arabidopsis* TOPLESS corepressor provides insight into the evolution of transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114** (30): 8107–8112.
- Matsui, K., Umemura, Y., and Ohme-Takagi, M.** (2008). AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **55** (6): 954–967.
- Matsumura, Y., Iwakawa, H., Machida, Y., and Machida, C.** (2009). Characterization of genes in the ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB) family in *Arabidopsis thaliana*, and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *The Plant Journal* **58** (3): 525–537.
- Matsuo, M., Johnson, J.M., Hieno, A., Tokizawa, M., Nomoto, M., Tada, Y., Godfrey, R., Obokata, J., Sherameti, I., Yamamoto, Y.Y., Böhmer, F.-D., and Oelmüller, R.** (2015). High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 Levels Result in Accumulation of Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana* Shoots and Roots. *Molecular Plant* **8** (8): 1253–1273.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J.** (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399** (6733): 271–275.
- Melcher, K., Ng, L.-M., Zhou, X.E., Soon, F.-F., Xu, Y., Suino-Powell, K.M., Park, S.-Y., Weiner, J.J., Fujii, H., Chinnusamy, V., Kovach, A., Li, J., Wang, Y., Li, J., Peterson, F.C., Jensen, D.R., Yong, E.-L., Volkman, B.F., Cutler, S.R., Zhu, J.-K., and Xu, H.E.** (2009). A Gate-Latch-Lock Mechanism for Hormone Signaling by Abscisic Acid Receptors. *Nature* **462** (7273): 602–608.
- Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J.P.** (2002). Classification of Plant Thioredoxins by Sequence Similarity and Intron Position. In *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species - Part A: Selenoproteins and Thioredoxin* (Elsevier), pp. 394–402.
- Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., and Day, D.A.** (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 79–104.
- Mitsuda, N., and Ohme-Takagi, M.** (2009). Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **50** (7): 1232–1248.

- Miura, K., Jin, J.B., and Hasegawa, P.M.** (2007a). Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10** (5): 495–502.
- Miura, K., Jin, J.B., Lee, J., Yoo, C.Y., Stirm, V., Miura, T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.-J., and Hasegawa, P.M.** (2007b). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19** (4): 1403–1414.
- Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G., Baek, D., Koo, Y.D., Jin, J.B., Bressan, R.A., Yun, D.-J., and Hasegawa, P.M.** (2005). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** (21): 7760–7765.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819** (2): 86–96.
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B.D., Bläsing, O., Usadel, B., Czechowski, T., Udvardi, M.K., Stitt, M., and Scheible, W.-R.** (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ* **30** (1): 85–112.
- Morrell, R., and Sadanandom, A.** (2019). Dealing With Stress: A Review of Plant SUMO Proteases. *Front. Plant Sci.* **10**: 1122.
- Müller, M., and Schmidt, W.** (2004). Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134** (1): 409–419.
- Mustroph, A., Albrecht, G., Hajirezaei, M., Grimm, B., and Biemelt, S.** (2005). Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing *E. coli* pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Annals of Botany* **96** (4): 717–726.
- Mustroph, A., Barding, G.A., Kaiser, K.A., Larive, C.K., and Bailey-Serres, J.** (2014). Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in *Arabidopsis* with a focus on primary C- and N-metabolism. *Plant, Cell & Environment* **37** (10): 2366–2380.
- Mustroph, A., Lee, S.C., Oosumi, T., Zanetti, M.E., Yang, H., Ma, K., Yaghoubi-Masihi, A., Fukao, T., and Bailey-Serres, J.** (2010). Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiol.* **152** (3): 1484–1500.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J.H., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J.** (2009). Profiling translatoemes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (44): 18843–18848.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., and Shinshi, H.** (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **140** (2): 411–432.
- Nakazawa, M., Ichikawa, T., Ishikawa, A., Kobayashi, H., Tshara, Y., Kawashima, M., Suzuki, K., Muto, S., and Matsui, M.** (2003). Activation tagging, a novel tool to dissect the functions of a gene family. *The Plant Journal* **34** (5): 741–750.
- Narsai, R., Rocha, M., Geigenberger, P., Whelan, J., and van Dongen, J.T.** (2011). Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *The New Phytologist* **190** (2): 472–487.

- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J.D.G., and Kamoun, S.** (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* **31** (8): 691–693.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M.A., Ha, C.V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., and Tran, L.-S.P.** (2013). *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** (12): 4840–4845.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H.** (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* **35** (2): 454–484.
- Novatchkova, M., Tomanov, K., Hofmann, K., Stuible, H.-P., and Bachmair, A.** (2012). Update on sumoylation: defining core components of the plant SUMO conjugation system by phylogenetic comparison. *The New Phytologist* **195** (1): 23–31.
- Oh, S.A., Park, K.S., Twell, D., and Park, S.K.** (2010). The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. *The Plant Journal* **64** (5): 839–850.
- Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C., and Oliver, D.J.** (2007). Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **49** (5): 878–888.
- Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H.** (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* **7** (2): 173–182.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *The Plant Cell* **13** (8): 1959–1968.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., and Tasaka, M.** (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19** (1): 118–130.
- Orozco-Cardenas, M., and Ryan, C.A.** (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (11): 6553–6557.
- Pacifici, E., Di Mambro, R., Dello Iorio, R., Costantino, P., and Sabatini, S.** (2018). Acidic cell elongation drives cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *The EMBO Journal* **37** (16).
- Pacifici, E., Polverari, L., and Sabatini, S.** (2015). Plant hormone cross-talk: The pivot of root growth. *Journal of Experimental Botany* **66** (4): 1113–1121.
- Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Li, L., and Luan, S.** (2005). ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139** (3): 1185–1193.
- Pandey, S.K., and Kim, J.** (2017). Coiled-coil motif in LBD16 and LBD18 transcription factors are critical for dimerization and biological function in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **13** (1).

- Pandey, S.P., Roccaro, M., Schön, M., Logemann, E., and Somssich, I.E.** (2010). Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **64** (6): 912–923.
- Papdi, C., Pérez-Salamó, I., Joseph, M.P., Giuntoli, B., Bögre, L., Koncz, C., and Szabados, L.** (2015). The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes RAP2.12, RAP2.2 and RAP2.3. *The Plant Journal* **82** (5): 772–784.
- Paponov, I.A., Teale, W., Lang, D., Paponov, M., Reski, R., Rensing, S.A., and Palme, K.** (2009). The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 126.
- Park, H.J., Kim, W.-Y., Park, H.C., Lee, S.Y., Bohnert, H.J., and Yun, D.-J.** (2011). SUMO and SUMOylation in plants. *Molecules and Cells* **32** (4): 305–316.
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.-F.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.-K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., and Cutler, S.R.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324** (5930): 1068–1071.
- Pedersen, O., Rich, S.M., and Colmer, T.D.** (2009). Surviving floods: leaf gas films improve O₂ and CO₂ exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. *The Plant Journal* **58** (1): 147–156.
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J., and Willmitzer, L.** (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (10): 4106–4113.
- Perata, P., and Alpi, A.** (1993). Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science* **93** (1-2): 1–17.
- Polidoros, A.N., Mylona, P.V., and Arnholdt-Schmitt, B.** (2009). Aox gene structure, transcript variation and expression in plants. *Physiologia Plantarum* **137** (4): 342–353.
- Ratcliffe, P.J.** (2013). Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *The Journal of Physiology* **591** (8): 2027–2042.
- Raymond, J., and Segrè, D.** (2006). The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science* **311** (5768): 1764–1767.
- Rehrig, E.M., Appel, H.M., Jones, A.D., and Schultz, J.C.** (2014). Roles for jasmonate- and ethylene-induced transcription factors in the ability of *Arabidopsis* to respond differentially to damage caused by two insect herbivores. *Front. Plant Sci.* **5**: 407.
- Reichheld, J.-P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C., and Meyer, Y.** (2002). The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: Specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* **40** (6-8): 685–690.
- Reynoso, M.A., Kajala, K., Bajic, M., West, D.A., Pauluzzi, G., Yao, A.I., Hatch, K., Zumstein, K., Woodhouse, M., Rodriguez-Medina, J., Sinha, N., Brady, S.M., Deal, R.B., and Bailey-Serres, J.** (2019). Evolutionary flexibility in flooding response circuitry in angiosperms. *Science* **365** (6459): 1291–1295.
- Riber, W., Müller, J.T., Visser, E.J.W., Sasidharan, R., Voeselek, L.A.C.J., and Mustroph, A.** (2015). The *greening after extended darkness1* is an N-end rule pathway mutant with high tolerance to submergence and starvation. *Plant Physiol.* **167** (4): 1616–1629.

- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., and van Dongen, J.T.** (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **152** (3): 1501–1513.
- Ros, R., Cascales-Miñana, B., Segura, J., Anoman, A.D., Toujani, W., Flores-Tornero, M., Rosa-Tellez, S., and Muñoz-Bertomeu, J.** (2013). Serine biosynthesis by photorespiratory and non-photorespiratory pathways: an interesting interplay with unknown regulatory networks. *Plant Biology* **15** (4): 707–712.
- Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J., and Krueger, S.** (2014). Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science* **19** (9): 564–569.
- Ruban, A.V.** (2015). Evolution under the sun: optimizing light harvesting in photosynthesis. *J Exp Bot* **66** (1): 7–23.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., and Scheible, W.-R.** (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21** (11): 3567–3584.
- Rytz, T.C., Miller, M.J., McLoughlin, F., Augustine, R.C., Marshall, R.S., Juan, Y.-T., Charng, Y.-Y., Scalf, M., Smith, L.M., and Vierstra, R.D.** (2018). SUMOylome Profiling Reveals a Diverse Array of Nuclear Targets Modified by the SUMO Ligase SIZ1 during Heat Stress. *The Plant Cell* **30** (5): 1077–1099.
- Sah, S.K., Reddy, K.R., and Li, J.** (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science* **7**: 571.
- Saitoh, H., and Hinchey, J.** (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (9): 6252–6258.
- Santaniello, A., Loreti, E., Gonzali, S., Novi, G., and Perata, P.** (2014). A reassessment of the role of sucrose synthase in the hypoxic sucrose-ethanol transition in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **37** (10): 2294–2302.
- Saracco, S.A., Miller, M.J., Kurepa, J., and Vierstra, R.D.** (2007). Genetic analysis of SUMOylation in *Arabidopsis*: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiol.* **145** (1): 119–134.
- Sarge, K.D.** (2016). Analysis of Protein Sumoylation. *Current Protocols in Protein Science* **83**: 14.8.1-8.
- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B.J., Colmer, T.D., Fagerstedt, K., Fukao, T., Geigenberger, P., Hebelstrup, K.H., Hill, R.D., Holdsworth, M.J., Ismail, A.M., Licausi, F., Moustroph, A., Nakazono, M., Pedersen, O., Perata, P., Sauter, M., Shih, M.-C., Sorrell, B.K., Striker, G.G., van Dongen, J.T., Whelan, J., Xiao, S., Visser, E.J.W., and Voesenek, L.A.C.J.** (2017). Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. *The New Phytologist* **214** (4): 1403–1407.
- Sasidharan, R., Hartman, S., Liu, Z., Martopawiro, S., Sajeev, N., van Veen, H., Yeung, E., and Voesenek, L.A.C.J.** (2018). Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiol.* **176** (2): 1106–1117.
- Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., and Stitt, M.** (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the

- regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* **136** (1): 2483–2499.
- Schmidt, R.R., Weits, D.A., Feulner, C.F.J., and van Dongen, J.T.** (2018). Oxygen Sensing and Integrative Stress Signaling in Plants. *Plant Physiol.* **176** (2): 1131–1142.
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T.A., Minx, P., Reily, A.D., Courtney, L., Kruchowski, S.S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., Rock, S.M., et al.** (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326** (5956): 1112–1115.
- Schopfer, P., Bajracharya, D., and Plachy, C.** (1979). Control of Seed Germination by Abscisic Acid: I. Time Course of Action in *Sinapis alba* L. *Plant Physiol.* **64** (5): 822–827.
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K.** (2002). Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & Integrative Genomics* **2** (6): 282–291.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., and Machida, Y.** (2001). The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128** (10): 1771–1783.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.-L., and Gao, C.** (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* **31** (8): 686–688.
- Shih, C.-F., Hsu, W.-H., Peng, Y.-J., and Yang, C.-H.** (2013). The NAC-like gene ANTHHER INDEHISCENCE FACTOR acts as a repressor that controls anther dehiscence by regulating genes in the jasmonate biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **65** (2): 621–639.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3** (3): 217–223.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58** (2): 221–227.
- Shiono, K., Yamauchi, T., Yamazaki, S., Mohanty, B., Malik, A.I., Nagamura, Y., Nishizawa, N.K., Tsutsumi, N., Colmer, T.D., and Nakazono, M.** (2014). Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* **65** (17): 4795–4806.
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C.G., and Springer, P.S.** (2002). The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.* **129** (2): 747–761.
- Silveira, A.B., Gauer, L., Tomaz, J.P., Cardoso, P.R., Carmello-Guerreiro, S., and Vincentz, M.** (2007). The *Arabidopsis* AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Science* **172** (6): 1148–1156.
- Song, C.-P., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Wang, P., and Zhu, J.-K.** (2005). Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* **17** (8): 2384–2396.

- Song, C.-P., and Galbraith, D.W.** (2006). AtSAP18, an orthologue of human SAP18, is involved in the regulation of salt stress and mediates transcriptional repression in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **60** (2): 241–257.
- Song, L., Huang, S.-S.C., Wise, A., Castanon, R., Nery, J.R., Chen, H., Watanabe, M., Thomas, J., Bar-Joseph, Z., and Ecker, J.R.** (2016). A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science* **354** (6312).
- Sorenson, R., and Bailey-Serres, J.** (2014). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111** (6): 2373–2378.
- Soyano, T., Thitamadee, S., Machida, Y., and Chua, N.-H.** (2008). ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30 and ASL20/LBD18 regulate tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20** (12): 3359–3373.
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., and Mateo, J.L.** (2015). CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PloS ONE* **10** (4): e0124633.
- Strodtkötter, I., Padmasree, K., Dinakar, C., Speth, B., Niazi, P.S., Wojtera, J., Voss, I., Do, P.T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Linke, V., Raghavendra, A.S., and Scheibe, R.** (2009). Induction of the *AOX1D* isoform of alternative oxidase in *A. thaliana* T-DNA insertion lines lacking isoform *AOX1A* is insufficient to optimize photosynthesis when treated with antimycin A. *Molecular Plant* **2** (2): 284–297.
- Summers, J.E., Ratcliffe, R.G., and Jackson, M.B.** (2000). Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus* absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large pasteur effect. *J Exp Bot* **51** (349): 1413–1422.
- Sun, L.R., Wang, Y.B., He, S.B., and Hao, F.S.** (2018). Mechanisms for Abscisic Acid Inhibition of Primary Root Growth. *Plant Signaling & Behavior* **13** (9): e1500069.
- Sweat, T.A., and Wolpert, T.J.** (2007). Thioredoxin h5 is required for victorin sensitivity mediated by a CC-NBS-LRR gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19** (2): 673–687.
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F.M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Ratcliffe, R.G.** (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* **15** (8): 462–470.
- Symington, L.S., and Gautier, J.** (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* **45**: 247–271.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K.-I., Shibata, D., Kobayashi, Y., and Ohta, H.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139** (3): 1268–1283.
- Tamang, B.G., and Fukao, T.** (2015). Plant Adaptation to Multiple Stresses during Submergence and Following Desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences* **16** (12): 30164–30180.
- Taramino, G., Sauer, M., Stauffer, J.L., Multani, D., Niu, X., Sakai, H., and Hochholdinger, F.** (2007). The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *The Plant Journal* **50** (4): 649–659.

- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K.** (2002). Plant defensins. *Planta* **216** (2): 193–202.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J.-i., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M., and Saito, K.** (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *The Plant Journal* **42** (2): 218–235.
- Ton, J., Flors, V., and Mauch-Mani, B.** (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* **14** (6): 310–317.
- Toujani, W., Muñoz-Bertomeu, J., Flores-Tornero, M., Rosa-Téllez, S., Anoman, A.D., Alseekh, S., Fernie, A.R., and Ros, R.** (2013). Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **163** (3): 1164–1178.
- Tsai, K.-J., Chou, S.-J., and Shih, M.-C.** (2014). Ethylene plays an essential role in the recovery of *Arabidopsis* during post-anaerobiosis reoxygenation. *Plant, Cell & Environment* **37** (10): 2391–2405.
- van Dongen, J.T., Fröhlich, A., Ramírez-Aguilar, S.J., Schauer, N., Fernie, A.R., Erban, A., Kopka, J., Clark, J., Langer, A., and Geigenberger, P.** (2009). Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of *Arabidopsis* plants. *Annals of Botany* **103** (2): 269–280.
- van Dongen, J.T., and Licausi, F.** (2015). Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 345–367.
- van Veen, H., Mustroph, A., Barding, G.A., Vergeer-van Eijk, M., Welschen-Evertman, R.A.M., Pedersen, O., Visser, E.J.W., Larive, C.K., Pierik, R., Bailey-Serres, J., Voeselek, L.A.C.J., and Sasidharan, R.** (2013). Two *Rumex* species from contrasting hydrological niches regulate flooding tolerance through distinct mechanisms. *The Plant Cell* **25** (11): 4691–4707.
- van Veen, H., Vashisht, D., Akman, M., Girke, T., Mustroph, A., Reinen, E., Hartman, S., Kooiker, M., van Tienderen, P., Schranz, M.E., Bailey-Serres, J., Voeselek, L.A.C.J., and Sasidharan, R.** (2016). Transcriptomes of Eight *Arabidopsis thaliana* Accessions Reveal Core Conserved, Genotype- and Organ-Specific Responses to Flooding Stress. *Plant Physiol.* **172** (2): 668–689.
- Varshavsky, A.** (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (22): 12142–12149.
- Varshavsky, A.** (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Science a publication of the Protein Society* **20** (8): 1298–1345.
- Varshavsky, A.** (2019). N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116** (2): 358–366.
- Vashisht, D., Hesselink, A., Pierik, R., Ammerlaan, J.M.H., Bailey-Serres, J., Visser, E.J.W., Pedersen, O., van Zanten, M., Vreugdenhil, D., Jamar, D.C.L., Voeselek, L.A.C.J., and Sasidharan, R.** (2011). Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *The New Phytologist* **190** (2): 299–310.
- Verma, V., Croley, F., and Sadanandom, A.** (2018). Fifty shades of SUMO: its role in immunity and at the fulcrum of the growth-defence balance. *Molecular Plant Pathology* **19** (6): 1537–1544.

- Vicente, J., Mendiondo, G.M., Movahedi, M., Peirats-Llobet, M., Juan, Y.-T., Shen, Y.-Y., Dambire, C., Smart, K., Rodriguez, P.L., Charng, Y.-Y., Gray, J.E., and Holdsworth, M.J. (2017). The Cys-Arg/N-End Rule Pathway Is a General Sensor of Abiotic Stress in Flowering Plants. *Current biology* CB **27** (20): 3183-3190.e4.
- Vicente, J., Mendiondo, G.M., Pauwels, J., Pastor, V., Izquierdo, Y., Naumann, C., Movahedi, M., Rooney, D., Gibbs, D.J., Smart, K., Bachmair, A., Gray, J.E., Dissmeyer, N., Castresana, C., Ray, R.V., Gevaert, K., and Holdsworth, M.J. (2018). Distinct branches of the N-end rule pathway modulate the plant immune response. *The New Phytologist*.
- Visser, E.J.W., BLOM, C.W.P.M., and Voeselek, L.A.C.J. (1996). Flooding-induced adventitious rooting in *Rumex* morphology and development in an ecological perspective. *Acta Botanica Neerlandica* **45** (1): 17–28.
- Voeselek, L.A.C.J., and Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: an overview. *The New Phytologist* **206** (1): 57–73.
- Voeselek, L.A.C.J., and Sasidharan, R. (2013). Ethylene--and oxygen signalling--drive plant survival during flooding. *Plant Biology* **15** (3): 426–435.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33** (5): 949–956.
- Vriezen, W.H., Zhou, Z., and van der Straeten, D. (2003). Regulation of submergence-induced enhanced shoot elongation in *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* **91 Spec No**: 263–270.
- Walton, A., Stes, E., Cybulski, N., van Bel, M., Iñigo, S., Durand, A.N., Timmerman, E., Heyman, J., Pauwels, L., Veylder, L. de, Goossens, A., Smet, I. de, Coppens, F., Goormachtig, S., and Gevaert, K. (2016). It's Time for Some "Site"-Seeing: Novel Tools to Monitor the Ubiquitin Landscape in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **28** (1): 6–16.
- Wang, C., Ding, Y., Yao, J., Zhang, Y., Sun, Y., Colee, J., and Mou, Z. (2015). *Arabidopsis* Elongator subunit 2 positively contributes to resistance to the necrotrophic fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **83** (6): 1019–1033.
- Wang, X., Zhang, S., Su, L., Liu, X., and Hao, Y. (2013). A genome-wide analysis of the LBD (LATERAL ORGAN BOUNDARIES domain) gene family in *Malus domestica* with a functional characterization of *MdLBD11*. *PLoS ONE* **8** (2): e57044.
- Wang, Z., Cao, G., Wang, X., Miao, J., Liu, X., Chen, Z., Qu, L.-J., and Gu, H. (2008). Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* **27** (1): 125–135.
- Wangwattana, B., Koyama, Y., Nishiyama, Y., Kitayama, M., Yamazaki, M., and Saito, K. (2008). Characterization of PAP1-upregulated Glutathione S-transferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* **25** (2): 191–196.
- Watanabe, K., Nishiuchi, S., Kulichikhin, K., and Nakazono, M. (2013). Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance? *Front. Plant Sci.* **4**.
- Weits, D.A., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten, H.-M., Riegler, H., Hoefgen, R., Perata, P., van Dongen, J.T., and Licausi, F. (2014). Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature Communications* **5**: 3425.

- Weits, D.A., Kunkowska, A.B., Kamps, N.C.W., Portz, K.M.S., Packbier, N.K., Nemeč Venza, Z., Gaillochet, C., Lohmann, J.U., Pedersen, O., van Dongen, J.T., and Licausi, F.** (2019). An apical hypoxic niche sets the pace of shoot meristem activity. *Nature* **569** (7758): 714–717.
- White, M.D., Kamps, J.J.A.G., East, S., Taylor Kearney, L.J., and Flashman, E.** (2018). The plant cysteine oxidases from *Arabidopsis thaliana* are kinetically tailored to act as oxygen sensors. *The Journal of Biological Chemistry* **293** (30): 11786–11795.
- White, M.D., Klecker, M., Hopkinson, R.J., Weits, D.A., Mueller, C., Naumann, C., O'Neill, R., Wickens, J., Yang, J., Brooks-Bartlett, J.C., Garman, E.F., Grossmann, T.N., Dissmeyer, N., and Flashman, E.** (2017). Plant cysteine oxidases are dioxygenases that directly enable arginyl transferase-catalysed arginylation of N-end rule targets. *Nature Communications* **8**: 14690.
- Wilkinson, K.A., and Henley, J.M.** (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical Journal* **428** (2): 133–145.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., and Chen, Q.-J.** (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* **14**: 327.
- Xu, C., Luo, F., and Hochholdinger, F.** (2016). LOB Domain Proteins: Beyond Lateral Organ Boundaries. *Trends in Plant Science* **21** (2): 159–167.
- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A.M., Bailey-Serres, J., Ronald, P.C., and Mackill, D.J.** (2006). Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442** (7103): 705–708.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y., and Huang, H.** (2003). Novel as1 and as2 defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 and ERECTA functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* **130** (17): 4097–4107.
- Xu, Z., Mahmood, K., and Rothstein, S.J.** (2017). ROS Induces Anthocyanin Production Via Late Biosynthetic Genes and Anthocyanin Deficiency Confers the Hypersensitivity to ROS-Generating Stresses in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **58** (8): 1364–1377.
- Yamauchi, T., Colmer, T.D., Pedersen, O., and Nakazono, M.** (2018). Regulation of Root Traits for Internal Aeration and Tolerance to Soil Waterlogging-Flooding Stress. *Plant Physiol.* **176** (2): 1118–1130.
- Yang, J., Liu, Y., Yan, H., Tian, T., You, Q., Zhang, L., Xu, W., and Su, Z.** (2018). PlantEAR: Functional Analysis Platform for Plant EAR Motif-Containing Proteins. *Frontiers in Genetics* **9**: 590.
- Yang, Y., Yu, X., and Wu, P.** (2006). Comparison and evolution analysis of two rice subspecies LATERAL ORGAN BOUNDARIES domain gene family and their evolutionary characterization from *Arabidopsis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39** (1): 248–262.
- Yates, G., Srivastava, A.K., and Sadanandom, A.** (2016). SUMO proteases: uncovering the roles of deSUMOylation in plants. *Journal of Experimental Botany* **67** (9): 2541–2548.
- Yeung, E., Bailey-Serres, J., and Sasidharan, R.** (2019). After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. *Trends in Plant Science*.
- Yeung, E., van Veen, H., Vashisht, D., Sobral Paiva, A.L., Hummel, M., Rankenberg, T., Steffens, B., Steffen-Heins, A., Sauter, M., Vries, M. de, Schuurink, R.C., Bazin, J., Bailey-Serres, J., Voeseenek, L.A.C.J., and Sasidharan, R.** (2018). A stress recovery signaling network for enhanced flooding

tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **115** (26): E6085-E6094.

- Yoshida, S., Ito, M., Callis, J., Nishida, I., and 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*. The Plant Journal **32** (1): 129–137.
- Zhang, F., Yao, J., Ke, J., Zhang, L., Lam, V.Q., Xin, X.-F., Zhou, X.E., Chen, J., Brunzelle, J., Griffin, P.R., Zhou, M., Xu, H.E., Melcher, K., and He, S.Y.** (2015). Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling. Nature **525** (7568): 269–273.
- Zhang, H., Gannon, L., Jones, P.D., Rundle, C.A., Hassall, K.L., Gibbs, D.J., Holdsworth, M.J., and Theodoulou, F.L.** (2018). Genetic interactions between ABA signalling and the Arg/N-end rule pathway during *Arabidopsis* seedling establishment. Sci Rep **8** (1): 179.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., and Ren, J.** (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. Nucleic Acids Research **42**: W325-30.
- Zheng, L., Baumann, U., and Reymond, J.-L.** (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. Nucleic Acids Research **32** (14): e115.
- Zhu, Q.-H., Guo, A.-Y., Gao, G., Zhong, Y.-F., Xu, M., Huang, M., and Luo, J.** (2007). DPTF: a database of poplar transcription factors. Bioinformatics **23** (10): 1307–1308.

6 Anhang

Vollständige Datensätze der Mikroarrays sowie der *Gene Ontology* Analysen befinden sich auf einer beigefügten Daten CD-ROM.

In Bezug zu *AtERF#111*:

- Daten A1 Mikroarraydaten, die in dieser Arbeit gezeigt wurden
- Daten A2 GO-Analyse differentiell exprimierter Gene

In Bezug zu *AtLBD41*:

- Daten A3 Mikroarraydaten, die in dieser Arbeit gezeigt wurden
- Daten A4 GO-Analyse differentiell exprimierter Gene

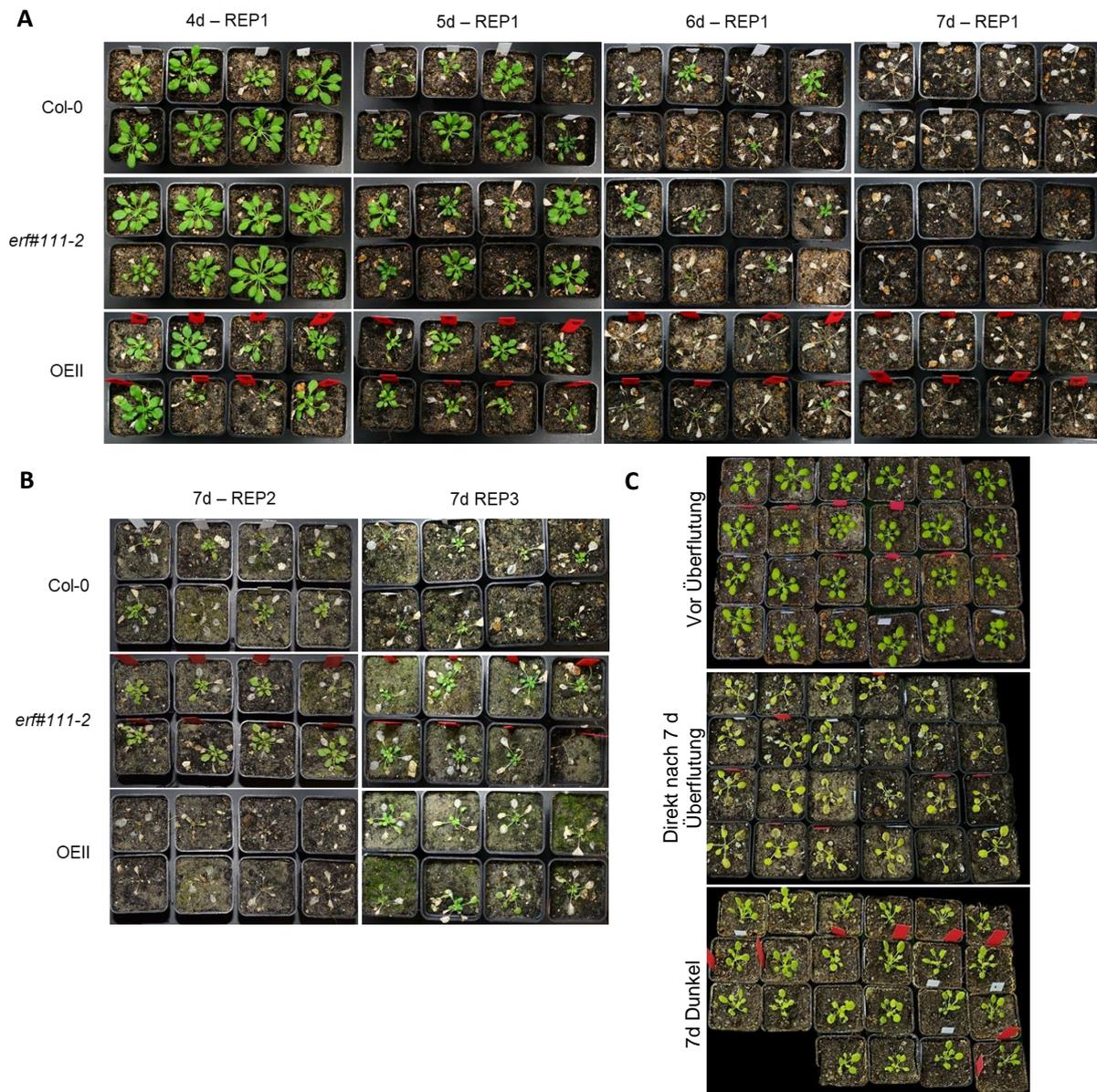


Abb. A 1 | Überleben nach Überflutung von *erf#111-2* und *ERF#111-OE* im Vergleich zu *Col-0*.

(A) Pflanzen von *Col-0*, *erf#111-2* und *ERF#111-OE II* (OEII) wurden im 10-Blattstadium für 4, 5, 6 und 7 Tage in Dunkelheit überflutet und danach zur Erholung 2 Wochen im KT inkubiert. **(B)** Aufnahmen von weiteren biologischen Replikaten. Die Pflanzen wurden für 7 Tage in Dunkelheit überflutet und zur Erholung 2 Wochen im KT inkubiert. **(C)** Repräsentative Aufnahmen der Pflanzen vor und direkt nach 7 Tagen Überflutung sowie der Kontrollen (7 Tage Dunkelheit + Luft). Weißes Etikett = *Col-0*, rotes Etikett = *erf#111-2*, kein Etikett = *ERF#111-OEII*.

Tab. A1 | Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide, die nach ihrer Funktion kategorisiert wurden.

Klonierungen	Sequenz (5'->3')	AGI code	Genname
attB1_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT		
attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT		
AtERF#111_GW_Cterm_fw	AAAAAGCAGGCTATATGTGTGTCTTAAAAGTGGC	AT5G64750	ERF#111
AtERF#111_GW_Cterm_rev	AGAAAGCTGGGTTGGAGGATGGACTATTATTGTAG	AT5G64750	ERF#111
AtERF#111_CtoA_GW_Cterm_MA	AAAAAGCAGGCTATATGGCTGTCTTAAAAGTGGC	AT5G64750	ERF#111
LBD40fw_mit Start	AAAAAGCAGGCTTAATGCGTATGAGTTGTAACG	AT1G67100	AtLBD40
LBD40rev_ohneStop	AGAAAGCTGGGTTCTCACTGCACACCAGTCCAA	AT1G67100	AtLBD40
LBD40rev_sh_noStop	AGAAAGCTGGGTTCCCGATCCAAGTCTTTGGTT	AT1G67100	AtLBD40
LBD42_fw_mitStart	AAAAAGCAGGCTTAATGAGAATCAGCTGCAACG	AT1G68510	AtLBD42
LBD42_rev_short_nostop	AGAAAGCTGGGTTGCCAACCTCGTTGATATCG	AT1G68510	AtLBD42
LBD42_rev_nostop	AGAAAGCTGGGTTACCAAGTCTGAGCTCTAAG	AT1G68510	AtLBD42
AtLBD41-K2R_fw	CCGGTTCTCCTCTCATCACAGCCTCCACG	AT3G02550	AtLBD41
AtLBD41-K2R_rev	CGTGGAGGCTGTGATGAGAGGAGAACCGG	AT3G02550	AtLBD41
LBD41_Os_fw	AAAAAGCAGGCTTAATGCGGATGAGTTGCAACG	LOC_Os01g0389	OsLBD41
LBD41_Os_rev_noStop	AGAAAGCTGGGTTGCTGGCAGCTCGAGCCGC	LOC_Os01g0389	OsLBD41
LBD41_Os_rev_short_noStop	AGAAAGCTGGGTTCCCGACCTCCTCCTCCTCC	LOC_Os01g0389	OsLBD41
CRISPR_LBD40D_fw	ATTGACCGCTGCGTCGCATGCGAT	AT1G67100	AtLBD40
CRISPR_LBD40D_rev	AAACATCGCATGCGACGCAGCGGT	AT1G67100	AtLBD40
LBD42_CRISPR2_fw	ATTGGGTGCGACGCGGATGCACT	AT1G68510	AtLBD42
LBD42_CRISPR2_rev	AAACAGTGCATCCGCGTCGCACC	AT1G68510	AtLBD42
prAOX1D_fw_BamHI	TCCAGGATCCACCACATACTCAACGTTCAA	AT1G32350	AtAOX1D
prAOX1D_rev_NcoI	ATTACCATGGGAGTAACAACAGTTGGGGTG	AT1G32350	AtAOX1D
prCYP71B22_fw_BamHI	AAAAGGATCCACGCGTTTTAAAGTCAAGAT	AT3G26200	AtCYP71B22
prCYP71B22_rev_NcoI	ATTGCCATGGTCTTGATTTGATCTGTTTTT	AT3G26200	AtCYP71B22
prEXPA1_fw_BamHI	AAAAGGATCCAAGGCACCTCCATCAGTAAT	AT1G69530	AtEXPA1
prEXPA1_rev_NcoI	ATTGCCATGGCGTTCTTTTTCTTTTTGTGT	AT1G69530	AtEXPA1

prGGT4_fw_BamHI	AAAAGGATCCTACTGGTTAGAGCACAGAAA	AT1G69820	AtGGT4
prGGT4_rev_NcoI	TTAACCATGGCTTCAATCTCTATCTCCTTT	AT1G69820	AtGGT4
prLBD39_fw_BamHI	ATATGGATCCTGTTTTCTTCTTCTTTTCGT	AT4G37540	AtLBD39
prLBD39_rev_NcoI	ATTGCCATGGTTCCTTTCCGAAATTTGAAA	AT4G37540	AtLBD39
prLBD40_fw_BamHI	AAAAGGATCCTTGTATTATCCAGCTAGCAC	AT1G67100	AtLBD40
prLBD40_rev_NcoI	AAAACCATGGTTTAGATGGGAAACAAAAA	AT1G67100	AtLBD40
prLBD41_fw_BamHI	TTATGGATCCACGGATGAGCTGTAATGGATGC	AT3G02550	AtLBD41
prLBD41_rev_XhoI	TTATCTCGAGGATCTTAAGAGGCGGACCTTG	AT3G02550	AtLBD41
prLBD42_fw_BamHI	AAAAGGATCCATGCTCAAAACAAAATCA	AT1G68510	AtLBD42
prLBD42_rev_NcoI	ATTACCATGGATTCCTTTATATGTTTATTA	AT1G68510	AtLBD42
prPDF1.2a_fw_BamHI	ATGCGGATCCACATGATTGGGGTGAAAATC	AT5G44420	AtPDF1.2a
prPDF1.2a_rev_NcoI	TTTTCCATGGGATGATTACTATTTTGT	AT5G44420	AtPDF1.2a
prPGDH_fw_BamHI	ATTTGGATCCATTGAGATGTTGATGCTATT	AT1G17745	AtPGDH
prPGDH_rev_NcoI	GCGGCCATGGGACTCTTTTTTTAATAATA	AT1G17745	AtPGDH
prPup10_fw_BamHI	AAAAGGATCCGAAACCGAAGTGTGTACC	AT4G18210	AtPUP10
prPup10_rev_NcoI	AAAACCATGGGGTGGATGTGGAATCACC	AT4G18210	AtPUP10
prRHODANESE_fw_BamHI	ACCTGGATCCTATTTTTGCTACTGAATTTA	AT2G17850	RHODANESE
prRHODANESE_rev_NcoI	ATTGCCATGGTTTGTGCTGAATTAGTTTTC	AT2G17850	RHODANESE
prSS3_fw_BamHI	AATAGGATCCTATGGTCTTTGGTGATTACC	AT1G74000	AtSS3
prSS3_rev_NcoI	ATTGCCATGGGTTTCTTTGGTTGTGTTCTTT	AT1G74000	AtSS3
prTH8_fw_BamHI	AAAAGGATCCAGATTGTCGATGTTGTTTGA	AT1G69880	AtTH8
prTH8_rev_NcoI	TTAACCATGGTGAGTGTGTCTCTCTCTC	AT1G69880	AtTH8
prGGT4-Os_rev_NcoI	ATTTCCATGGGGGCGGGCGGGGCGCTG	AT1G69820	AtGGT4
prGGT4-Os_fw_BamHI	AATAGGATCCCCTGGGTAATTCATTCCGT	AT1G69820	AtGGT4
prPGDH2-Os_rev_NcoI	ATTTCCATGGTTTCTCCGATCGATGGGAGC	LOC_Os08g3472	OsPGDH
prPGDH2-Os_fw_BamHI	AATAGGATCCATGCGGCTAGGGGTAGAAAA	LOC_Os08g3472	OsPGDH
prPUP1.1-Os_rev_MscI	ATTATGGCCAATTGATAGAGGGTGTCTGCT	LOC_Os04g4975	OsPUP1.1
prPUP1.1-Os_fw_BamHI	AATAGGATCCCCTGGAGGCGTTGTGTTAG	LOC_Os04g4975	OsPUP1.1
prPUP3.1-Os_rev_NcoI	ATAACCATGGGATCAAATGAAGCAGTGCTA	LOC_Os03g0888	OsPUP3.1
prPUP3.1-Os_fw_BamHI	TTAAGGATCCAAACAGCGGAGGGGAATAA	LOC_Os03g0888	OsPUP3.1

prPUP3.2_Os_rev_Ncol	ATAACCATGGCCCACGCACGCGTGTGCG	LOC_Os09g2923	OsPUP3.2
prPUP3.2_Os_fw_BamHI	TTTTGGATCCGTCTAGTTTTCGTCCCTCCTCT	LOC_Os09g2923	OsPUP3.2
Semiquantitative RT-PCR/ Genotypisieren			
AtERF#111_fw	TGAAGGTAGCGGAGAAGGGA	AT5G64750	AtERF#111
AtERF#111_fw2	TCCAATTGCATCAAGAGTCG	AT5G64750	AtERF#111
AtERF#111_rev	TCGAAGCAGGTCTTATGGGC	AT5G64750	AtERF#111
GGT4_fw	ACCGGTGAGACTTGCTATAA	AT1G69820	AtGGT4
GGT4_rev	CACCGCTGGAATTATATGCA	AT1G69820	AtGGT4
Lb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		
LBD39_fw	AAAGGTTGCAGTGAAACATG	AT4G37540	AtLBD39
LBD39_rev	TCTCATCCATTTTCCCAAC	AT4G37540	AtLBD39
LBD40_fw	GCTCATGAACCTCCTCAACAC	AT1G67100	AtLBD40
LBD40_rev	GTACCACCACGTGATTTCCAC	AT1G67100	AtLBD40
LBD41_fw	GCAAGCTAACGCAACTGTCTT	AT3G02550	AtLBD41
LBD41_rev	ACGCCGATCCTTCTTCTTA	AT3G02550	AtLBD41
LBD42_fw	CACACCTCTTCCAAGTGCA	AT1G68510	AtLBD42
LBD42_rev	CAAGATTTGGAGAACTTTGATT	AT1G68510	AtLBD42
PGDH_fw	ACTTCGTGCAATGATCACAA	AT1G17745	AtPGDH
PGDH_rev	TTCAAGTCCAACGGTTCATC	AT1G17745	AtPGDH
PUP10_fw	GGCGGATCAAGAACTACAAA	AT4G18210	AtPUP10
PUP10_rev	GAAAGGCTAGCTGTTGTAGG	AT4G18210	AtPUP10
RAB18_fw	GAGGAGGAGGATACGGAAGT	AT5G66400	AtRAB18
RAB18_rev	GCTTTTCCTTGATCTTGCCA	AT5G66400	AtRAB18
RD22_fw	CGACGTAGGAGTCGGTAAAGG	AT5G25610	AtRD22
RD22_rev	CGTCTTCTTAGCCACCTCAGT	AT5G25610	AtRD22
Tub_ATH_fw	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA	AT5G62690	AtTUB2
Tub_ATH_rev	TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	AT5G62690	AtTUB2
quantitative Real-Time-PCR			
EF1alpha_realttime_fw	TGAGCACGCTCTTCTGCTTCA	AT5G60390	AtEF1alpha

EF1alpha_realtime_rev	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA	AT5G60390	AtEF1alpha
sgCYP71B22_fw	AGGAGTCATGTCGGATGTGTTT	AT3G26200	AtCYP71B22
sgCYP71B22_rev	TCGGATGTCTGGCTAGCTCT	AT3G26200	AtCYP71B22
sgAtERF#111_fw	AAAGGAGGAGAGAGGTGGAGGA	AT5G64750	AtERF#111
sgAtERF#111_rev	ACTTTAGAAGTAGAGCTACCACCG	AT5G64750	AtERF#111
sgEXPA1_fw	CACAATGGGAGGTGCTTG TG	AT1G69530	AtEXPA1
sgEXPA1_rev	TGAATAGAGCCGTGCTTAGCG	AT1G69530	AtEXPA1
sgLBD39_fw	TGAACTCCAACGTCCTGCTTT	AT4G37540	AtLBD39
sgLBD39_rev	TGAACTCCAACGTCCTGCTTT	AT4G37540	AtLBD39
sgPDF1.1-1.3_fw	GTGGAAGCACAGAAGTTGTGC	multiple PDFs	
sgPDF1.1-1.3_rev	GCTGGGAAGACATAGTTGCA	multiple PDFs	
sgPUP10_fw	ACGGCGGATCAAGA ACTACAAA	AT4G18210	AtPUP10
sgPUP10_rev	ACGGCGGATCAAGA ACTACAAA	AT4G18210	AtPUP10
sgRAB18_fw	TTGGGAGGAATGCTTCACCG	AT5G66400	AtRAB18
sgRAB18_rev	TTGTCCATCATCCTCCGAGC	AT5G66400	AtRAB18
sgRHODANESE_fw	TCTTCCTCGCACA ACTACATCA	AT2G17850	RHODANESE
sgRHODANESE_rev	ACTCTTCAACAGTTCTGACATCAAG	AT2G17850	RHODANESE
sgSS3_fw	TGGCTAAGAAGATCGCCGAC	AT1G74000	AtSS3
sgSS3_rev	CAACACATCCCTAGGGCCAA	AT1G74000	AtSS3
sgTH8_fw	CAACAAGCTGCTGGTGATCG	AT1G69880	AtTH8
sgTH8_rev	ACATCGGTGTATTTAGCAGCCA	AT1G69880	AtTH8
sgLBD41_fw	GTTCTTCGGAAAGGGTGTAGTGAG	AT3G02550	AtLBD41
sgLBD41_rev	CATAGAACTTGCGGAGAAAGACAG	AT3G02550	AtLBD41

Tab. A2 | Übersicht der verwendeten Vektorkonstrukte. Angegeben sind Ursprungsvektoren, deren Quellen, klonierte Derivate und deren Verwendung in der vorliegenden Arbeit.

Ursprungsvektoren	Quelle	Derivate	Verwendung
<i>p70SRUC</i>	Stahl et al. (2004)	<i>pBT10-rLUC</i>	Normalisierung der LUC Expression
<i>pBT10GAL4UAS</i>	Wehner et al. (2011)	<i>prAtCYP71B22:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtEXPA1:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtGGT4:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtLBD39:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtLBD40:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtLBD41:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtLBD42:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtPAP1:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtPDF1.2a:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtPGDH:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtPUP10:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtRHODANESE:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtSS3:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prAtTH8:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prOsGGT4:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prOsPUP1.1:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prOsPUP3.1:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prOsPUP3.2:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
		<i>prOsPGDH:fLUC</i>	LUC Reporter im Protoplastensystem
<i>p35S:HA-GW</i>	Ehlert et al. (2006)	<i>p35S:HA-AtERF#111</i>	Effektor im Protoplastensystem
<i>p35S:GW-HA</i>	Ehlert et al. (2006)	<i>p35S:(MC)AtERF#111-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem/ CHX-Chase
		<i>p35S:(MA)AtERF#111-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem/ CHX-Chase
		<i>p35S:AtLBD37-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD39-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD40-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD41-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD42-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem

		<i>p35S:OsLBD41-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:GW-HA:VP16</i>	Effektor im Protoplastensystem
<i>p35S:HA-GFP</i>	Klecker et al. (2014)		Effektor im Protoplastensystem
<i>p35S:GW:VP16-HA</i>	Philipp Gasch	<i>p35S:AtLBD37ΔEAR:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD39ΔEAR:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD40ΔEAR:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD41ΔEAR:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:AtLBD42ΔEAR:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:OsLBD41ΔEAR:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
		<i>p35S:GFP:VP16-HA</i>	Effektor im Protoplastensystem
<i>p35S-rfA-HBD</i>	Monika Tomar	<i>p35S:AtERF#111-HBD</i>	DEX induzierte nukleare Translokation
		<i>p35S:GFP-HBD</i>	DEX induzierte nukleare Translokation
<i>p35S:GBD-GW</i>	Ehlert et al. (2006)	<i>p35S:BD-GFP</i>	Fusion an Gal4UAS Bindedomäne
		<i>p35S:BD-RAP2.2</i>	Fusion an Gal4UAS Bindedomäne
		<i>p35S:BD-AtLBD41</i>	Fusion an Gal4UAS Bindedomäne
<i>p35S:HF-GATA</i>	Mustroph et al. (2010)	<i>p35S:HF-AtERF#111</i>	Stabile Überexpressionslinien in <i>A. thaliana</i>
<i>pMDC83-GFP</i>	Curtis und Grossniklaus (2003)	<i>p35S:(MC)AtERF#111-GFP</i>	Lokalisation
		<i>p35S:(MA)AtERF#111-GFP</i>	Lokalisation
<i>pK7FWG2</i>	Karimi et al. (2002)	<i>p35S:AtLBD40-GFP</i>	Transiente Transformation in Tabak
		<i>p35S:AtLBD41-GFP</i>	Transiente Transformation in Tabak
		<i>p35S:AtLBD41(K2R)-GFP</i>	Transiente Transformation in Tabak
	Willi Riber	<i>p35S:HA-AtLBD41-GFP</i>	Stabile Überexpressionslinien in <i>A. thaliana</i>
		<i>pK7FWG2:VP16-HA</i>	Binärer Vektor zur Fusion von VP16
<i>pK7FWG2:VP16-HA</i>	Judith Bäumler	<i>p35S:AtLBD41ΔEAR:VP16-HA</i>	Stabile Überexpressionslinien in <i>A. thaliana</i>
<i>pBGWL7</i>	Karimi et al. (2005)	<i>pBGWL7_prAtERF#111:LUC</i>	Stabile LUC-Promotor-Reporterlinien
<i>pKSE401</i>	Xing et al. (2014)	<i>AtU6-26(P):AtLBD40-p35S:Cas9</i>	CRISPR/Cas9 Genomeditierung
<i>pHSE401</i>	Xing et al. (2014)	<i>AtU6-26(P):AtLBD42-p35S:Cas9</i>	CRISPR/Cas9 Genomeditierung

Tab. A3 | Übersicht über die Daten, die durch von mir betreute Studierende erhoben wurden.

Verweis	Beitrag	Name
Abb. 10 Analyse der ABA-Sensitivität der Keimung	Durchführung aller Replikate (A + B)	Leon Müller
Abb. 11 Einfluss von ABA auf das Wurzelwachstum und das Gewicht von Keimlingen	Durchführung aller Replikate (A + B)	Leon Müller
Abb. 14 Verwundungsabhängige Induktion von prAtERF#111:fluc	Durchführung des gesamten Experiments	Leon Müller
Abb. 29 AtLBD40, AtLBD41 und AtLBD42 können die Promotoren der Zielgene regulieren	Durchführung aller Replikate (A + C)	Lukas Stahl
Abb. 30 Test der Transregulation ausgewählter AtLBD41 Zielgene durch AtLBD37 und AtLBD39	Durchführung aller Replikate (C)	Laura Israel
Abb. 32 Test der Transregulation putativer LBD41 Zielgene in Reis durch Effektoren aus Arabidopsis und Reis	Durchführung aller Replikate (A)	Jan Missun
Abb. 32 Test der Transregulation putativer LBD41 Zielgene in Reis durch Effektoren aus Arabidopsis und Reis	Durchführung aller Replikate (B)	Sarah Nitsche
Abb. 35 Überlebensexperimente bei Sauerstoffmangel mit der Dreifachmutante <i>lbd40/41/42</i>	Durchführung der Überflutungsexperimente (A)	Lukas Stahl
Abb. 36 Analyse von <i>LBD41</i> -Überexpressionslinien	Durchführung Western-Blot (A)	Florian Zerwas
Abb. 38 SUMOylierung von AtLBD41 im transienten Tabak-System	Durchführung des gesamten Experiments	Lukas Stahl

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zu dem Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Angelika Mustroph für die hervorragende Betreuung und die stete Bereitschaft, mich bei meiner Arbeit zu unterstützen. Zudem bin ich sehr dankbar, dass Angelika mir spannende Konferenzen und einen Aufenthalt im Ausland ermöglicht hat.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Stephan Clemens und Dr. Michael Weber für konstruktive und wertschätzende Zusammenarbeit.

Ich danke unseren ehemaligen Doktoranden Willi Riber, Philipp Gasch und Natalia Hess, die wichtige Vorarbeit geleistet haben und mir zudem vor allem in der Anfangszeit mit Rat und Tat im Labor zur Seite standen. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie für die freundliche und angenehme Atmosphäre und die vielen schönen Unternehmungen bedanken.

Vielen Dank an Simon Richter für seine stete Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Jana Müller, welche mich mein gesamtes Studium begleitet hat und in dieser Zeit zu einer sehr guten Freundin geworden ist, welche auch jede noch so doofe Frage gerne beantwortet.

Herzlicher Dank gilt auch Dr. Alfons Weig und den Mitarbeitern der zentralen Genomanalytik und Bioinformatik für die Vorbereitung und Beratung hinsichtlich der Mikroarrays. Vielen Dank an Maria Klecker und Dr. Nico Dissmeyer für die erfolgreiche Zusammenarbeit und insbesondere im Fall von Maria für die Durchführung der bedeutsamen CHX-Chase Experimente sowie für viele hilfreiche Anregungen zu meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Julia Bailey-Serres und Sonja Winte für die spannende und sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Vielen Dank an meine Studenten Johannes Mansky, Florian Zerwas, Malte Bartylla, Marina Selle, Moritz Fundinger, Fabian Hollmann, Sarah Nitsche, Jan Missun, Marlen Soltau, Laura Israel, Lukas Stahl und Leon Müller, deren hervorragende Daten mit in die Arbeit eingeflossen sind.

Zudem möchte ich mich meinen Eltern Michaela und Wolfgang, meiner Schwester Kathrin, Felix und meinen Freunden für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken. Zuletzt danke ich noch meinem Andi.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift