



Die funktionelle Rolle der Transkriptionsfaktoren
bZIP1 und bZIP53 in der *Arabidopsis*
thaliana-Wurzel nach Salzstress

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Laura Hartmann
aus Northeim

Würzburg 2014

Eingereicht am: 01.04.2014

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Engstler

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Zweitgutachter: PD Dr. Dirk Becker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Salzstress in der Pflanze	5
3.2	Signaltransduktion nach Salzstress	7
3.3	Die Bedeutung des C/S1 bZIP Transkriptionsfaktor-Netzwerkes für die Anpassung an Stressbedingungen	12
3.4	Zielsetzung	15
4	Material	17
4.1	Organismen	17
4.1.1	Bakterien	17
4.1.2	Pflanzen	17
4.2	Nukleinsäuren	19
4.2.1	Plasmide	19
4.2.2	Oligonukleotide	20
4.3	Größenstandards	22
4.3.1	Protein-Größenstandard	22
4.4	Antikörper	22
4.5	Nährmedien und Zusätze	23
4.5.1	Bakterienmedien	23
4.5.2	Pflanzenmedien	23
4.5.3	Medienzusätze	23
4.6	Lösungen und Puffer	24
4.7	Geräte	28
4.8	Verbrauchsmaterial	30
4.9	Chemikalien	30
4.10	Enzyme	31
4.11	Kits	31
4.12	Computerprogramme	32

5 Methoden	33
5.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
5.1.1 Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Samen für die Anzucht in Hydroponik oder auf MS-Platten	33
5.1.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Hydroponik	33
5.1.3 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf MS-Platten	34
5.1.4 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	34
5.2 Abiotische Stressbedingungen für Pflanzen	35
5.2.1 Zur Auswertung in qPCR	35
5.2.2 Für Phänotypen-Bestimmung	35
5.2.3 In Protoplasten	36
5.3 Kultivierung und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	36
5.3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36
5.3.2 Herstellung kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i>	36
5.3.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Hitzeschock	37
5.4 RNA	37
5.4.1 RNA-Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
5.4.2 RNA-Gel	38
5.5 Reverse Transkriptase-PCR zu Herstellung von cDNA	38
5.6 Quantitative Real-Time-PCR	39
5.7 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.7.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.7.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
5.7.3 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
5.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
5.8 Western-Blot Analyse	41
5.8.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzen	41
5.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
5.8.3 Proteintransfer auf PVDF-Membranen	42
5.8.4 Immunodetektion mit dem ECL-System	42
5.9 Transiente Protoplasten-Transformation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
5.9.1 Gewinnung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten	43
5.9.2 PEG-Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten in Mikrotiterplatte	44
5.9.3 Messung der Luciferase (LUC)-Aktivität	45
5.10 Microarray	45
5.11 Metabolomanalyse	45

5.12	Aminosäuremessung	45
5.12.1	Extraktion der Aminosäuren	45
5.12.2	Derivatisierung und Messung	46
5.13	Zuckermessung	46
5.13.1	Extraktion der Zucker	46
5.13.2	Messung der Zucker	47
5.14	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	47
5.14.1	Kreuzvernetzung der DNA-Protein-Komplexe	48
5.14.2	Isolation der Kerne	48
5.14.3	Fragmentierung des Chromatins	49
5.14.4	Immunopräzipitation	50
6	Ergebnisse	52
6.1	Die Induktion von <i>bZIP1</i> in der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wurzel wird durch unterschiedliche Stresse hervorgerufen	52
6.1.1	Die Expression der bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 bZIP1 und bZIP53 wird durch Salz induziert	52
6.1.2	<i>bZIP1</i> wird durch osmotischen Stress induziert	53
6.1.3	Die Expression von <i>bZIP1</i> wird durch ABA verstärkt, ist aber unabhängig vom klassischen ABA-Signaltransduktionsweg . . .	54
6.1.4	Die salzinduzierte Expression von <i>bZIP1</i> wird durch die Hexokinase HXK1 vermittelt	57
6.1.5	Die salzinduzierte Expression von <i>bZIP1</i> ist von der SnRK1-Signaltransduktion abhängig	59
6.1.6	Calcium ist an der salzinduzierten Expression von <i>bZIP1</i> beteiligt	60
6.1.7	Die Signaltransduktionswege zur Aktivierung von <i>bZIP1</i> über HXK1 bzw. SnRK1 sind unabhängig von ABA	63
6.2	<i>bzip1</i> -Keimlinge zeigen keinen Phänotyp nach Salzstress	65
6.3	In der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wurzel spielen bZIP1 und bZIP53 eine Rolle in der metabolischen und transkriptionellen Anpassung an Salzstress . .	67
6.3.1	Der Wildtyp zeigt in der Wurzel schnelle und starke transkriptionelle Veränderungen nach Salzstress	67
6.3.2	Die <i>bzip1/bzip53</i> -T-DNA-Insertionslinie zeigt eine differentielle Genexpressionen nach Salzstress im Vergleich zum Wildtyp . . .	72
6.3.3	Die Transkriptionsfaktoren bZIP1 und bZIP53 haben eine Funktion im Aminosäureabbau unter Salzstress	77
6.3.4	Die <i>bzip1/bzip53</i> -Mutante spielt eine Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel	82

6.4	bZIP1 ist Teil eines regulatorischen Signaltransduktionsnetzwerks nach abiotischem Stress	88
7	Diskussion	93
7.1	Verschiedene stress- und energieabhängige Signale werden auf dem <i>bZIP1</i> -Promotor vereint	93
7.2	Nach Salzstress sind bZIP1 und bZIP53 Teil der Reprogrammierung des Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus in der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wurzel	96
7.3	Stressresponsive Gene werden durch verknüpfte ABA-abhängige und ABA-unabhängige Signaltransduktionswege reguliert	100
8	Anhang	124
8.1	Zuckermessung in der <i>gin2</i> -Mutante	124
8.2	Wurzellänge in Mutanten des C/S1-Netzwerks nach Salzstress	125
8.3	Stärkemessung im Wildtyp nach Salzstress	125
8.4	Daten der Microarrayanalyse des Wildtyps nach Salzstress	126
8.5	Daten der Microarrayanalyse der <i>bzip1/bzip53</i> -Mutante nach Salzstress	141
8.6	Originaldaten der Zuckermessung	152
8.7	Originaldaten der Aminosäuremessung	155
8.8	Promotorsequenz von BCAT2	165
8.9	Metabolite des Citratzyklus in Wildtyp und <i>bzip1/bzip53</i> nach Salzstress	166
8.10	Interaktion von bZIP1 und bZIPs der Gruppe A in Protoplasten	167
9	Abkürzungsverzeichnis	168
9.1	Allgemeine Abkürzungen	168
9.2	Einheiten	171
9.3	Präfixe	171
9.4	Aminosäuren	171
9.5	Nukleotide	172
10	Danksagung	173

1 Zusammenfassung

Die zunehmende Versalzung des Bodens führt weltweit zu starken Ernteeinbußen. Obwohl die Wurzeln der Pflanzen als erstes mit dem Salzstress in Berührung kommen, ist noch nicht viel über Signaltransduktionswege in Wurzeln zur Anpassung der Pflanze an Salzstress bekannt. Die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1, bZIP1 und bZIP53, werden gewebespezifisch in der Wurzel nach Salzstress aktiviert. In dieser Arbeit werden diese bZIPs in ein Netzwerk eingeordnet, von der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren bis zur Funktion in der Regulation des Stoffwechsels in der salzgestressten Pflanze.

Die Aktivierung von bZIP1 kann über verschiedene sowohl ionische als auch osmotische Stimuli erfolgen und ist abhängig von Calcium, der HEXOKINASE 1 und SnRK1-Kinasen (Snf1 RELATED PROTEIN KINASE 1). Die dunkelinduzierte Expression von *bZIP1* wird HXK1-abhängig durch Glucose inhibiert, bei Energiemangelbedingungen ist die Aktivierung von *bZIP1* SnRK1-abhängig. Beide Enzyme spielen auch in der salzinduzierten Expression von *bZIP1* eine Rolle. Über Transkriptom- und Metabolomanalysen kann gezeigt werden, dass bZIP1 und bZIP53 an der Umprogrammierung des Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus teilhaben. Besonders Gene der Glukoneogenese (*PYRUVAT ORTHOPHOSPHAT DIKINASE* und *FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE*) bzw. des Aminosäurekatabolismus (*BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2*, *METHYLCROTONYL-COA-CARBOXYLASE A* und *HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE*) werden von den Transkriptionsfaktoren reguliert. Das spricht für eine Umprogrammierung des Metabolismus und der Mobilisierung von Energie aus Aminosäuren zur Anpassung an die Stressbedingungen. Die Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 bilden vorzugsweise Heterodimere mit der Gruppe C. Mit Mutantenanalysen, die zum einen die Transkriptionsfaktoren des C/S1-Netzwerks und zum anderen Komponenten der Abscisinsäure (ABA) abhängigen Signaltransduktion beinhalten, konnte ein Signaltransduktionsnetzwerk aufgestellt werden, das die Antwort auf abiotischen Stress mittels des Signalwegs über ABA, SnRK2 und AREB (ABA RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING PROTEIN) mit der SnRK1-vermittelten Antwort auf Energiemangelbedingungen in der Pflanze verknüpft. Die gefundenen stress- bzw. energieresponsiven Gene konnten nach den Mutantenanalysen auf Grund ihrer unterschiedlichen Regulation in vier Klassen eingeteilt werden,

wovon nur eine, die Klasse 4, von dem C/S1 Netzwerk reguliert wird. Die Klassen 1-3 sind unabhängig von den bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C. Die Klasse 1 bilden typische ABA-responsive Gene, die von den Gruppe A-bZIPs reguliert werden. Faktoren der Gruppe A sind auch an der Expression der Gene der Klasse 2 beteiligt, diese werden aber auch durch bZIP1 und bZIP53 induziert. Dieser Klasse konnten Gene zugeordnet werden, die im Abbau verzweigt-kettiger Aminosäuren eine Rolle spielen. Am Aminosäureabbau sind außerdem die Gene der Klasse 2 beteiligt. Für diese Gene konnte eine Expressionsregulation durch bZIP1 und bZIP53 gezeigt werden. Für die Bestimmung möglicher Heterodimerisierungspartner bedarf es noch weiterer Analysen. Dieses Modell, das den abiotischen Stress abhängigen ABA-Signalweg mit dem energieabhängigen SnRK1-Signaltransduktionsweg verknüpft, zeigt die präzise Regulation von mindestens 4 Gen-Klassen, deren Expression durch die Kombination verschiedener bZIP-Transkriptionsfaktoren aktiviert wird.

2 Summary

Increasing salinization of soil has led to significant crop loss worldwide. Notwithstanding the fact that plant roots are the first to be affected by salt stress, signal transduction pathways in roots for salt stress adaptation are still mostly unknown. In this work the group S1 bZIP transcription factors bZIP1 and bZIP53 that are specifically induced by salt stress in roots, were functionally characterized with respect to their role in salt stress response in plants. Transcriptional activation of *bZIP1* can be mediated by both ionic and osmotic stimuli and is dependent on Ca^{2+} , HEXOKINASE 1 (HXK1) and the SnRK1 kinases (Snf1 RELATED PROTEIN KINASE 1). Dark induced expression of *bZIP1* is inhibited by glucose depending on HXK1 activity. In starvation conditions the transcription of *bZIP1* is mediated by SnRK1. Here both signaling enzymes are shown to be involved in salt induced *bZIP1* transcription. Transcriptome and metabolome analyses reveal an important function of bZIP1 and bZIP53 concerning the reprogramming of primary carbohydrate and amino acid metabolism during salt stress in the *Arabidopsis* root. Particularly genes involved in gluconeogenesis (*PYRUVAT ORTHOPHOSPHAT DIKINASE* and *FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE*) or amino acid catabolism (*BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2*, *METHYLCROTONYL-COA-CARBOXYLASE A* and *HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE*) are regulated by these transcription factors. This points to reprogramming of metabolism and remobilization of energy by amino acid degradation under stress. Group S1 bZIPs preferably form heterodimers with group C bZIP transcription factors. Mutant analyses of C/S1 bZIPs and ABA signaling components, respectively, revealed a complex network connecting abiotic stress responses via ABA-SnRK2-AREB (ABA RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING PROTEIN) to SnRK1 mediated starvation responses. The detected genes were grouped in four classes according to their different regulation, of which only class 4 is regulated by the C/S1 network. Classes 1-3 are controlled independently of group C transcription factors. Class 1 contains typical ABA responsive genes, regulated by group A bZIPs. These are also involved in gene expression of class 2 genes, which are as well induced by bZIP1 and bZIP53. Genes of branched chain amino acid catabolism belong to this class. Also involved in amino acid catabolism are genes of class 2, these genes were shown to be transcriptionally regulated by bZIP1 and bZIP53. Further analyses are required to

reveal possible heterodimerization partners. This model, that links the abiotic stress responding ABA pathway to the energy dependent SnRK1 signaling pathway, reveals at least four gene classes that are very precisely regulated by combining different bZIP transcription factors.

3 Einleitung

Durch ihre Standortgebundenheit sind Pflanzen ständig schwankenden Umweltbedingungen ausgesetzt. Pflanzen müssen ihre Lebensweise somit an sich verändernde Temperaturen, Lichtverhältnisse, Wasserverfügbarkeit sowie Bodenbeschaffenheit und Nährstoffversorgung anpassen. Schränken diese Umweltbedingungen das Wachstum oder die Vermehrung der Pflanzen ein, spricht man von Stress. Diese Arbeit behandelt das Thema Salzstress in der Wurzel und die daraus hervorgehende transkriptionelle und metabolische Anpassung von *Arabidopsis thaliana* im Bezug auf den Transkriptionsfaktor bZIP1.

3.1 Salzstress in der Pflanze

Neben vielen abiotischen Stressen ist Salzstress einer der schwerwiegendsten Faktoren, die auf Pflanzen wirken können (Locy et al. (1996)). Jährlich werden dem Salzstress bis zu 25-30 % Ernteeinbußen geschuldet (Kronzucker and Britto, 2011). Salzstress schädigt Pflanzen hauptsächlich auf zwei verschiedene Arten: Hohe Salzkonzentrationen im Boden stören in der Pflanze die Aufnahmefähigkeit von Wasser. Dieses wird benötigt, um sämtliche physiologische Prozesse in der Pflanze aufrecht zu erhalten. Außerdem wird der Transport in die oberirdischen Teile dadurch erschwert (Verslues et al., 2006). Hohe Konzentrationen an Na^+ -Ionen in der Pflanze können toxisch sein und zu einem Natrium-induzierten Nährstoffmangel führen (Verslues et al., 2006). In photosynthetisch aktivem Gewebe kann es wichtige Komponenten wie Enzyme, Chlorophyll und Carotenoide (Davenport et al., 2005) beeinflussen, was eine geringere Photosyntheseleistung und somit zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge haben kann (Flowers et al., 1977; Greenway and Munns, 1980; Yeo, 1998). Die Aktivität von antioxidativen Enzymen, wie Katalase, Ascorbat-Peroxidase, Gluthation-Reduktase und Superoxid-Dismutase steigt nach Salzsstress an (Mittova et al., 2002, 2004). Die Bildung von ROS führt dann zu einer Reduzierung der Zellexpansion, der Assimilatproduktion, der Membranfunktion sowie des cytosolischen Metabolismus (Zhu, 2001, 2002; Hasegawa et al., 2000; Munns, 2002; Munns and Tester, 2008). Im Normalfall können ROS durch antioxidative Mechanismen abgebaut werden. Salzstress kann jedoch solche Mechanismen inhibieren (Allan and Fluhr, 1997; Foyer and Noctor, 2013).

Pflanzen haben im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, die es ihnen möglich machen, auf salzhaltigen Böden zu wachsen und sich an die Stressbedingungen anzupassen. Es gibt hauptsächlich zwei verschiedene Arten, wie Pflanzen toleranter gegenüber Salzstress werden: Vermeidung von Salzstress und Anpassung an Salzstress (Munns and Tester, 2008).

Die Kompartimentierung der Ionen ist essentiell, da der Salzstress das Ionen-Gleichgewicht stört. Somit werden die Na^+ -Ionen auf die Zellen aufgeteilt, um die Konzentrationen im Cytoplasma so gering wie möglich (10-30 mM) zu halten (Carden et al., 2003). Das Salz wird vorwiegend in der Vakuole oder anderen Zellkompartimenten gespeichert, um die metabolischen Funktionen der Pflanze zu schützen (Zhu, 2003). Eine weitere, aber auch energieaufwendigere Möglichkeit ist die Ausscheidung der Ionen über Drüsen, Haare oder Wurzeln.

Wenn Na^+ - und Cl^- -Ionen in der Vakuole gespeichert sind, werden sogenannte kompatible Osmolyte im Cytosol akkumuliert. Diese interagieren auch in hohen Konzentrationen nicht mit dem zellulären Metabolismus und gleichen den osmotischen Druck der Ionen in der Vakuole aus (Flowers et al., 1977; Ford, 1984). Die Hauptkategorie der organischen Osmolyte besteht aus Monosacchariden, wie Glukose und Fruktose, Zuckeralkoholen (Glycerol und Methylinositole) und komplexen Zuckern wie Trehalose, Raffinose und Fructane. Außerdem werden noch Aminosäurederivate wie Prolin und Aspertat und Schwefelverbindungen dazu gezählt (Zhifang and Loescher, 2003). Eine erhöhte Salztoleranz konnte beispielsweise in transgenen Pflanzen gezeigt werden, die kompatible Osmolyte wie Mannitol (Karakas et al., 1997) oder Prolin (Hong et al., 2000) akkumulieren.

Der SOS (*salt overly sensitive*) Signaltransduktionsweg ist ein weiterer Mechanismus zur Anpassung an Salzstress. Das System erkennt hier einen salzinduzierten Calcium-Konzentrationsanstieg (Zhu, 2002). SOS3 als Ca^{2+} -Sensor leitet zunächst das Signal an SOS2, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, weiter und aktiviert diese. SOS2 phosphoryliert den Na^+/H^+ -Antiporter SOS1, der Na^+ aus dem Cytosol in den Apoplasten transportiert und somit die Ionenkonzentrationen wieder ausgleichen kann (Shi et al., 2000).

Die Photosyntheseleistung der Pflanze wird bei Salzstress oft herabgesetzt, daher ist auch eine metabolische Anpassung der Pflanze nötig, um das Energiegleichgewicht aufrecht zu erhalten. Kempa et al. (2008) konnten in *Arabidopsis*-Blättern bereits zeigen, dass durch Salzstress eine massive metabolische Umprogrammierung hervorgerufen wird, die hauptsächlich den Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus betrifft. Es konnte sowohl ein verstärkter Anstieg von Raffinose, Trehalose, Serin und Prolin als auch der Abbau von Stärke beobachtet werden. Das spricht für eine schnelle Anpassung der Pflanzen an Salzstress, die hauptsächlich darauf beruht Speicherstoffe, wie Stärke,

zu mobilisieren und zum Energiegewinn abzubauen. Zur metabolischen Anpassung in der *Arabidopsis*-Wurzel nach Salzstress ist jedoch noch nicht viel bekannt.

3.2 Signaltransduktion nach Salzstress

Pflanzen müssen in der Lage sein, ihre Umwelt wahrzunehmen und Stresse zu erkennen, um ihre Physiologie und ihre Entwicklung diesen Bedingungen anzupassen.

Sensoren, die Salzstress wahrnehmen, sind noch nicht beschrieben, es wird jedoch vermutet, dass die Perzeption in der Membran stattfindet (Christmann et al., 2013). Der Membranrezeptor AHK1 (ARABIDOPSIS HISTIDIN KINASE 1) wurde als Osmosensor und positiver Regulator in der Signaltransduktion nach osmotischem Stress beschrieben. Eine Überexpression von *AHK1* zeigt eine erhöhte Toleranz gegenüber osmotischem Stress, die *ahk1*-Mutante hingegen ist sensitiver (Tran et al., 2007; Wohlbach et al., 2008). Trotzdem scheint AHK1 nicht der einzige, bzw. Hauptrezeptor zu sein (Osakabe et al., 2013).

Der *second messenger* Calcium ist eines der vielseitigsten Signalmoleküle in allen eukaryotischen Organismen (Lynch et al., 1989; Kiegle et al., 2000; Shi et al., 2000; Tracy et al., 2008). Durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Trockenheit, Salz, osmotischer Stress, Temperatur, wird eine Veränderung in der Ca^{2+} -Konzentration hervorgerufen, die für jeden dieser Stimuli so spezifisch ist, dass man von einer *Ca²⁺-Signature* sprechen kann, die die Stimulus spezifischen Informationen widerspiegelt. Die *Ca²⁺-Signatures* werden durch genaueste Regulation von Ca^{2+} -Kanälen und -Transportern in den verschiedenen Zellorganellen gestaltet (Dodd et al., 2010; Kudla et al., 2010; Sanders et al., 1999). Durch Ca^{2+} wird z.B. der SOS-Signalweg aktiviert, wodurch sich die Pflanze an Salzstress anpasst. Laohavisit et al. (2013) konnten kürzlich zeigen, dass ANNEXIN 1 (AtANN1) auf hohe NaCl-Konzentrationen reagiert und somit eine tragende Rolle in der pflanzlichen Anpassung auf Salzstress in der Wurzel spielt.

Viele regulatorische Prozesse in Pflanzen sind abhängig von Phytohormonen. Sie spielen eine Rolle in Wachstum, Entwicklung und bei der Reaktion auf Umweltfaktoren (Lumba et al., 2010). Bei abiotischem Stress wie Kälte, Trockenheit, Verwundung oder Salz müssen sich die Pflanzen anpassen. Dieser Anpassungsprozess wird hauptsächlich über das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) kontrolliert (Umezawa et al., 2006).

ABA kommt ubiquitär in allen Gefäßpflanzen vor und ist auch in Tier und Mensch zu finden (Bruzzone et al., 2007). Die ABA-Synthese findet zunächst in den Plastiden statt. Dort wird IPP (ISOPENTYL DIPHOSPHATE) aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat synthetisiert. Über Phytoen und Lycopon wird daraus Zeaxanthin gebildet, aus dem Neoxanthin oder Violaxanthin entsteht, wobei Violaxanthin

auch vollständig zu Neoxanthin umgewandelt wird (North et al., 2007). NCED3 (9-*cis*-EPOXYCORITENIOD DIOXYGENASE 3) ist das Schlüsselenzym der ABA-Biosynthese und katalysiert die Spaltung von 9-*cis*-Neoxanthin (C₄₀) zu Xanthoxin (C₁₅). Xanthoxin wird anschließend ins Cytoplasma transportiert und dort mit Hilfe von ABA2 über ein Abscisin-Aldehyd zu Abscisinsäure umgewandelt. Neben der *de novo*-Synthese kann ABA auch aus einem inaktiven Glukose-Ester-Konjugat durch eine β -Glucosidase am endoplasmatischen Reticulum freigesetzt werden. Diese Verbindungen haben den Vorteil, dass sie gut über lange Distanzen im Xylem transportiert werden können (Jiang and Hartung, 2008). Das bedeutet, dass die Intensität des ABA-Signals an der Wirkungsstelle nicht automatisch der absoluten Menge des Hormons entspricht.

ABA ist ein wichtiges Phytohormon, das eine Rolle in der Antwort auf verschiedene Stresse spielt. Die exogene Applikation von ABA suggeriert der Pflanze eine Stresssituation. Da viele abiotische Stresse zu Wassermangel und osmotischem Ungleichgewicht führen, überschneiden sich die Expressionsprofile der stressresponsiven Gene nach Stress durch Kälte, Trockenheit, Salz oder ABA-Applikation. Das lässt darauf schließen, dass verschiedene Stresssignale dieselben bzw. Teile der selben Signaltransduktionswege teilen und dass diese miteinander interagieren, um das Gleichgewicht der Zelle aufrecht zu erhalten (Thomashow, 1999; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Osmotischer Stress durch Salz führt teils zu ABA-abhängiger teils zu ABA-unabhängiger Signaltransduktion (Liu et al., 2013). In der ABA-abhängigen Signaltransduktion wird die Transkription von Genen die z.B. für bZIPs der Gruppe A kodieren, wie *AREB1* (*ABA RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 1*), reguliert (Jakoby et al., 2002). In der Promotorregion des induzierten Gens ist meistens ein *cis*-Element zu finden, und zwar das ABRE-Element (ABA responsive Element, Motiv: CACGTGGC) (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Thomashow, 1999; Uno et al., 2000).

Andere Transkriptionsfaktoren, wie DREB2 (DROUGHT-RESPONSIVE ELEMENT BINDING 2), die zur ERF-Familie (ETHYLEN RESPONSE BINDING) gehören, spielen eine Rolle in der ABA-unabhängigen Signaltransduktion. *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 29A*) zum Beispiel ist ein Gen, dessen erhöhte Transkription nach Stress auf ABA-abhängige und ABA-unabhängige Regulation zurückzuführen ist (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993). In der Promotorregion des Gens ist ein DRE-Element (DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT) zu finden. Diese Sequenz (TACCGACAT) stellt ein *cis*-Element dar, das die ABA-unabhängige Induktion von *RD29A* durch Kälte und Trockenheit reguliert. Die Expression des Gens kann jedoch auch durch ABA induziert werden.

In den letzten Jahren gab es viele unterschiedliche Veröffentlichungen zur ABA-Rezeption (Razem et al., 2006; Zhang et al., 2002; Liu et al., 2007), die später überarbeitet wurden (Risk et al., 2008; Müller and Hansson, 2009; Guo et al., 2008). Die Rezeptoren auf denen das aktuelle ABA-Signaltransduktions-Modell beruht, wurden von vier verschiedenen Gruppen gleichzeitig entdeckt (Park et al., 2009; Ma et al., 2009; Santiago et al., 2009; Nishimura et al., 2010) (s. Abbildung 3.2).

Die PYR/PYL/RCAR Familie (*PYRBACTIN RESISTANCE 1/PYRBACTIN RESISTANCE-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR*) der ABA Rezeptoren besteht aus 14 Mitgliedern (Lumba et al., 2010; Raghavendra et al., 2010; Cutler et al., 2010; Klingler et al., 2010), von denen wenigstens 13 eine Rolle in der ABA-Perzeption spielen (Fujii et al., 2009). Die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie haben die Fähigkeit mit PP2Cs (PROTEIN PHOSPHATASE 2CA) zu interagieren. Zum Beispiel gehören die als negative ABA-Regulatoren beschriebenen Gene wie ABA INSENSITIVE 1 (ABI1) und ABI2 zu einer Unterfamilie der CA-PP2Cs (Schweighofer et al., 2004). RCAR3 wurde als Bindungspartner von ABI1 und ABI2 identifiziert (Szostkiewicz et al., 2010), PYR1 bildet einen Komplex mit HAB1 (HYPERSENSITIVE TO ABA1), der wie ABI1 und ABI2 eine dephosphorylierende Wirkung hat. Zudem zeigte eine *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4*-Quadruplemutante viele Einschränkungen in der ABA-Antwort wie z.B. ABA-induzierte Genexpression, SnRK2-Aktivierung (SUCROSE NON FERMENTING RELATED KINASE 2) (Park et al., 2009) oder Stomata-Schließen (Nishimura et al., 2010).

Die SnRK2 Familie sind Serin/Threonin-Kinasen und gehören zur SnRK-Genfamilie (Halford and Hey, 2009). In *Arabidopsis thaliana* wird die Familie in drei Untergruppen geteilt (SnRK1, SnRK2 und SnRK3). SnRK2 und SnRK3 spielen in der ABA-Antwort und in der Signaltransduktion nach Stress eine Rolle (Hrabak et al., 2003; Halford et al., 2003). Ein Mitglied der SnRK3-Familie ist unter anderem SOS2 (SALT OVERLY SENSITIVE 2), das in die Calcium-vermittelte Signaltransduktion nach Salzstress involviert ist (Liu et al., 2000). SnRK2 und SnRK3 sind nur in Pflanzen zu finden, SnRK1 hingegen ist das pflanzliche Ortholog zu Snf1 (SUCROSE NON-FERMENTING1) aus Hefe bzw. den AMPK (AMP- ACTIVATED PROTEIN KINASE) aus Säugetieren (s. Abbildung 3.1).

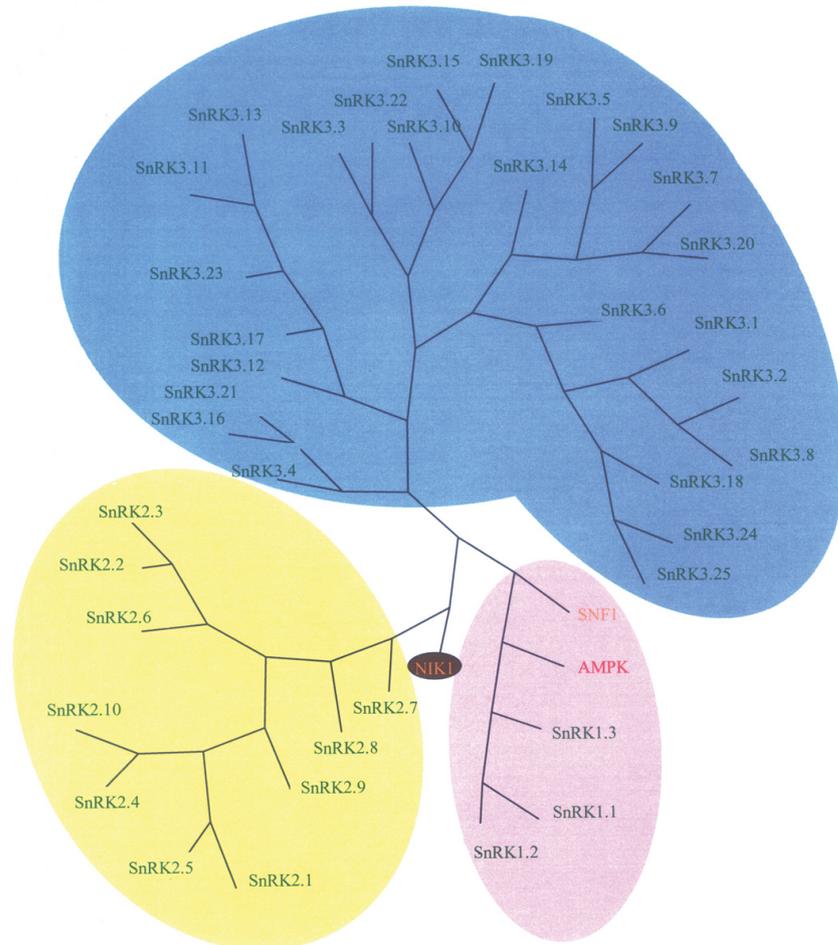


Abbildung 3.1: **Stammbaum der SnRK Familie aus *Arabidopsis thaliana***: Dargestellt sind die Untergruppen SnRK1, SnRK2 und SnRK3 aus *Arabidopsis thaliana* sowie Snf1, Nik1 (Hefe) und AMPK (Säugetiere) (Halford and Hey, 2009).

Das aktuelle ABA-Signaltransduktionsmodell ergibt sich aus der möglichen Regulierung der SnRK2-Aktivität durch PYR/PYL und PP2Cs (Park et al., 2009; Soon et al., 2012).

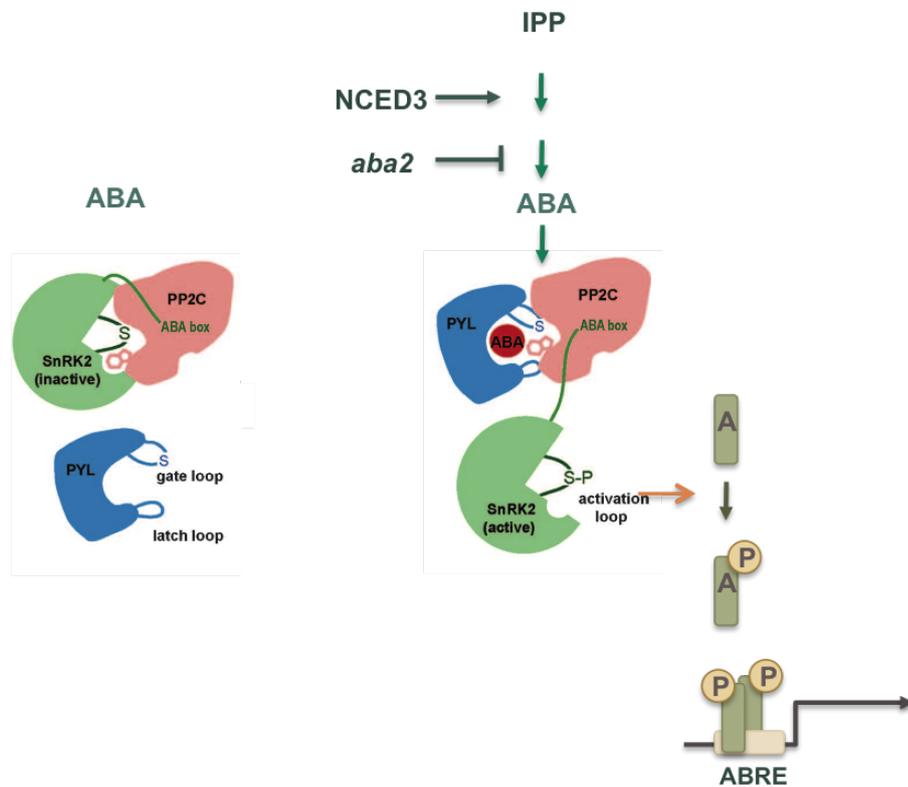


Abbildung 3.2: Vereinfachte Darstellung des ABA-Signaltransduktionswegs (abgewandelt nach Soon et al. (2012)): Ist kein ABA in der Zelle bindet PP2C an SnRK2 und inhibiert es somit. Wird ABA aus IPP synthetisiert, bindet ein Komplex aus ABA und PYL an PP2C und inhibiert es. Das führt zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung von SnRK2. Diese phosphoryliert und aktiviert dadurch nun einige AREB-Transkriptionsfaktoren (z.B. AREB1, AREB2), die an ABRE-Elemente (Bindemotiv: CACGTGGC) in Promoterregionen von ABA-responsiven Genen binden und somit die Genexpression aktivieren (Fujita et al., 2009).

In der Abbildung 3.2 ist der ABA-Signaltransduktionsweg vereinfacht dargestellt. Ist kein ABA in der Zelle vorhanden, bindet PP2C an die Kinase-Domäne von SnRK2 und inhibiert durch Dephosphorylierung die Kinase-Aktivität. Wird ABA aus IPP synthetisiert, bindet ein Komplex aus ABA und RCAR/PYL an PP2C und hemmt die katalytische Aktivität. Die PYL-vermittelte Hemmung von PP2C führt zu einer Autophosphorylierung und somit zur Aktivierung von SnRK2 (Soon et al., 2012). Sobald SnRK2 aktiv ist, phosphoryliert es dann direkt Zielgene, wie z.B. AREB/ABF-Transkriptionsfaktoren. Durch die Phosphorylierung werden diese aktiviert und können an Promotoren binden, die ABRE-Elemente enthalten. AREB/ABF-Transkriptionsfak-

toren gehören zu den bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe A (Jakoby et al., 2002) (s. Abbildung 3.3). Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle in der Signaltransduktion nach ABA oder abiotischem Stress und werden in der Pflanze durch Kälte, Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen bzw. ABA aktiviert (Choi et al., 2000; Finkelstein and Lynch, 2000; Lopez-Molina et al., 2001; Uno et al., 2000).

3.3 Die Bedeutung des C/S1 bZIP Transkriptionsfaktor-Netzwerkes für die Anpassung an Stressbedingungen

Die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe A sind nicht die einzigen bZIPs, die eine Rolle der Anpassung an Stress in der Pflanze eine Rolle spielen.

Innerhalb des *AtGenExpress*-Projekts wurde gezeigt, dass die Genexpression von *bZIP1* und *bZIP53* durch Salzstress induziert wird. Die Daten zeigen jedoch deutlich, dass die Expression der beiden Transkriptionsfaktorgene nur in der Wurzel und nicht im Blatt nach Salzgabe induziert wird. Von Sun et al. (2012) wurde gezeigt, dass die Transkription von *bZIP1* nach Salz, Kälte und osmotischem Stress in der Wurzel induziert wird. Auf phänotypischer Ebene war zu sehen, dass zum einen Keimlinge von *bzip1*-Mutanten viel anfälliger bezüglich der Keimung auf salzhaltigem Medium sind, zum anderen dass bZIP1-Überexpressionspflanzen eine erhöhte Stresstoleranz zeigen. Die Funktion von bZIP1 ist jedoch noch ungeklärt.

bZIP1 gehört zur größten Gruppe der bZIP-Transkriptionsfaktoren (Gruppe S). Zu ihr gehören 17 Transkriptionsfaktoren mit einer Masse von 15 bis 20 kDa (Jakoby et al., 2002). Sie bestehen aus einem Leucinzipper mit acht heptameren Wiederholungen sowie der zentralen basischen Bindedomäne. Die Gensequenzen dieser Gruppe weisen keine Introns aus. Aufgrund der Aminosäuresequenz der basischen Domäne und der des Leucinzippers, sowie ihren Heterodimerisierungseigenschaften ist die Gruppe S zusätzlich in drei Untergruppen (S1, S2 und S3) unterteilt (Ehlert et al., 2006). Zur Gruppe S1 zählen die Transkriptionsfaktoren bZIP1, bZIP2, bZIP11, bZIP44 und bZIP53.

Es ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 bei der Bindung an Zielpromotoren vorzugsweise Heterodimere mit der Gruppe C bilden. Das konnte zunächst über eine Protein-Protein-Interaktion in Yeast-two-Hybrid gezeigt werden, die dann sowohl in einer Analyse in *Arabidopsis*-Mesophyll-Protoplasten, als auch in BIFC (Bimolecular Fluorescence) bestätigt wurde (Ehlert et al., 2006; Weltmeier et al., 2006; Kang et al., 2010). Zur Gruppe C gehören bZIP9, bZIP10, bZIP25 und bZIP63 (Ehlert et al., 2006), wobei bZIP10 und bZIP25 am engsten verwandt sind (Jakoby et al., 2002).

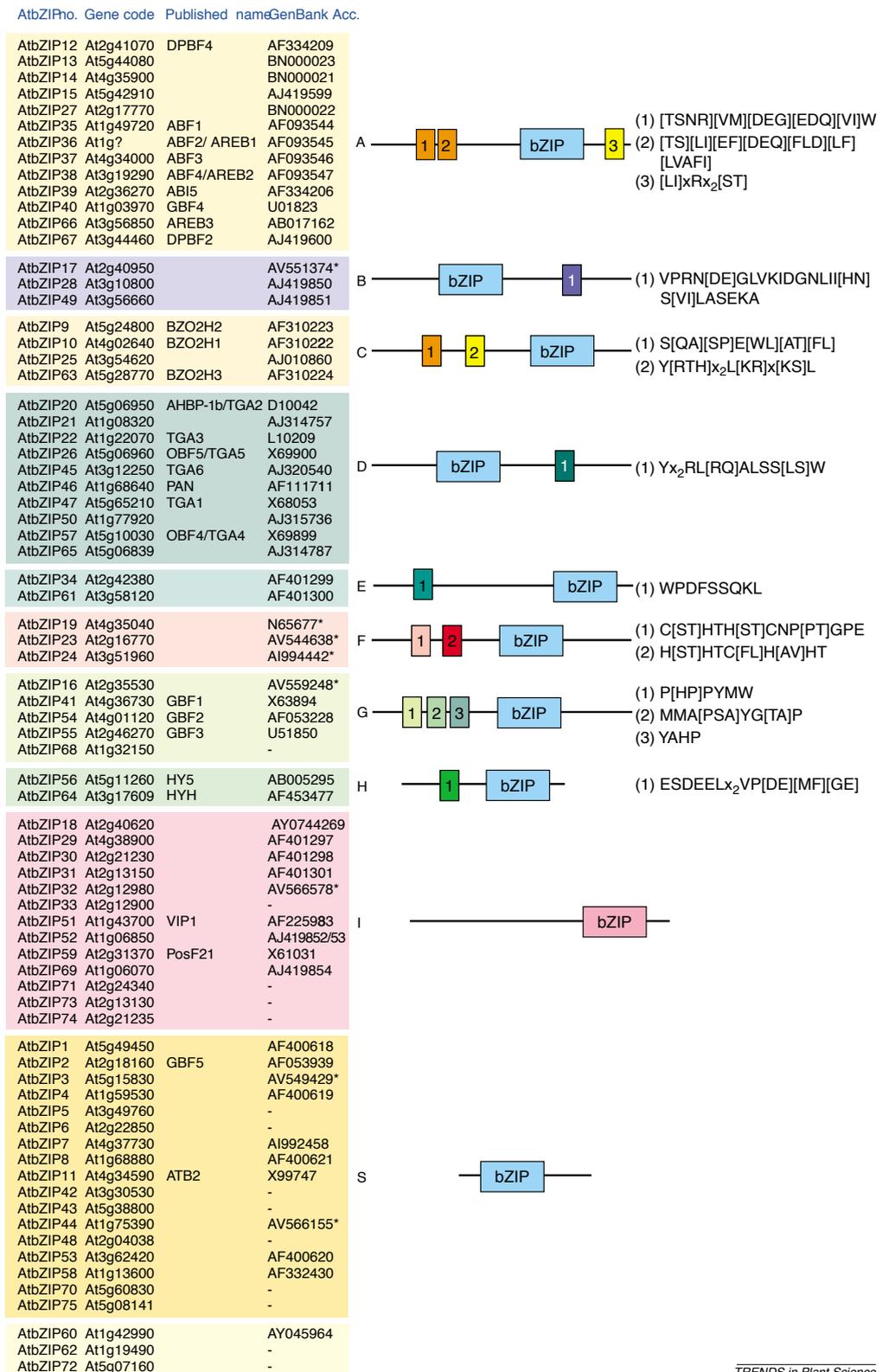


Abbildung 3.3: Die zehn Gruppen der bZIP-Transkriptionsfaktoren Die bZIP-Transkriptionsfaktoren wurden aufgrund von Sequenzhomologien der basischen Region, sowie von weiteren konservierten Motiven mit Hilfe des MEME Analyse-Programms (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>) in zehn Gruppen eingeteilt. Benannt wurden die Gruppen mit Buchstaben bezüglich der jeweils bekanntesten Mitglieder (z.B. A = AREB/ABF) oder der Proteingröße (S = small). (Jakoby et al., 2002)

bZIP-Transkriptionsfaktoren binden meist an regulatorische *cis*-Elemente, die die Konsensussequenz ACGT enthalten (Guilinan et al., 1990; Schindler et al., 1992; Sib eril et al., 2001). Aber die Sequenzen, die dieses Kernmotiv umgeben, sind für eine effiziente DNA-Bindung auch von Bedeutung (Izawa et al., 1993; Foster et al., 1994). Die Bindemotive sind hier meistens palindromische Sequenzen, z.B. in der A-Box (TACGTA), der C-Box (GACGTC) oder in der G-Box (CACGTG) (Izawa et al., 1993), es kommen aber auch nicht palindromische Motive vor, wie z.B. das ABRE-Motiv (CACGTGGC) (Choi et al., 2000).

Für das C/S1-Netzwerk konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine maßgebliche Rolle in der metabolischen Anpassung auf Stress spielen. Dietrich et al. (2011) konnten z.B. zeigen, dass unter Energiemangelbedingungen durch Dunkelinduktion bZIP1 und sein nächster Verwandter bZIP53 direkt an *ASN1 (ASPARAGIN SYNTHETASE 1)* und *PRODH1 (PROLINE DEHYDROGENASE1)*, die im Aminosäuremetabolismus eine Rolle spielen, binden.

Für bZIP1, bZIP2, bZIP11 und bZIP53 konnte von Baena-Gonzalez et al. (2007) gezeigt werden, dass sie bei Energiemangelbedingungen ein Teil der Signaltransduktion sind, die durch die SnRK1-Kinasen (Snf1 RELATED KINASES) KIN10 und KIN11 reguliert wird. Jedoch ist noch nicht bekannt, ob diese direkt die Transkriptionsfaktoren phosphorylieren.

In *Arabidopsis thaliana* gibt es 38 SnRKs von denen drei (SnRK1.1, SnRK1.2 und SnRK1.3) ortholog zu Snf1 (*sucrose non fermenting1*) aus Hefe bzw. AMPK aus Säugetieren sind (Halford et al., 2003; Polge and Thomas, 2007; Hardie, 2011) (s. Abbildung 3.1). Vieles spricht dafür, dass SnRK1-Proteinkinasen ein Sammelpunkt für verschiedene Signaltransduktionswege, ausgelöst durch verschiedene Signale, wie z.B. Hormone und Stress, während Wachstum und Entwicklung, darstellen (Radchuk et al., 2006; Baena-Gonzalez et al., 2007; Ananieva et al., 2008; Baena-Gonz alez and Sheen, 2008; Jossier et al., 2009; Coello et al., 2012; Tsai and Gazzarrini, 2012).

Energiemangel, der durch verminderte Kohlenhydratvorkommen oder herabgesenkte Photosyntheseleistung in Stresssituationen hervorgerufen wird, führt zu der Aktivierung von SnRK1-Proteinkinasen. KIN10 und KIN11 sind zentrale Regulatoren eines Transkriptionsfaktor-Netzwerkes, das die Genexpression unter Stressbedingungen (z.B. Energiemangel) steuert, dadurch wird das Gleichgewicht wieder hergestellt. Außerdem wird durch metabolische und transkriptionelle Umprogrammierung eine langfristige Anpassung der Pflanze an den Stress hervorgerufen (Radchuk et al., 2006; Schwachtje et al., 2006; Baena-Gonzalez et al., 2007; Baena-Gonz alez and Sheen, 2008; Lee et al., 2009). Erst kürzlich wurde von Rodrigues et al. (2013) gezeigt, dass zwei der PP2Cs, ABI1 und PP2CA, negative Regulatoren der SnRK1 sind. Diese interagieren mit der

katalytischen Untereinheit, dephosphorylieren diese und inaktivieren sie somit. Zudem werden durch SnRK1 und ABA überschneidende transkriptionelle Antworten induziert. Über die PP2C werden also zwei wichtige Signaltransduktionswege reguliert.

Zucker dient in der Pflanze nicht nur als Energiequelle, sondern stellt auch ein wichtiges Signalmolekül dar (Hanson and Smeekens, 2009). Es wurden zehn Zucker-responsive bZIP-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* gefunden (Price et al., 2004), von denen bZIP1 die stärkste Antwort auf Zucker gezeigt hat. Entgegengesetzt den üblichen Zucker-Markergenen, die sehr langsam auf hohe Zucker-Konzentrationen reagieren (Jang et al., 1997), zeigt die Transkription von *bZIP1* eine schnelle und sensitive Reaktion. Durch Glukose kann z.B. die dunkelinduzierte bZIP1-Expression inhibiert werden (Kang et al., 2010; Dietrich et al., 2011). Diese Inhibierung ist von der HEXOKINASE1 (HXK1) abhängig, die eine der Hauptsensoren für Glukose ist (Moore et al., 2003). So konnte *bZIP1* nach Zuckergabe nicht im Wildtyp, jedoch in der *gin2*-Mutante (*glucose insensitive 2*) detektiert werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass bZIP1 das Keimlingswachstum inhibiert, sobald keine Zuckerquelle vorhanden ist (Kang et al., 2010).

Für alle Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 konnte eine Saccharose-induzierte Repression der Translation (SIRT) festgestellt werden (Weltmeier et al., 2009). Es wurde von Wiese et al. (2004) gezeigt, dass sich bei den fünf Transkriptionsfaktoren in einer langen 5'UTR (untranslatierte Region) vier überlappende uORFs (upstream open reading frames) befinden, von denen vor allem uORF2 die SIRT reguliert (Rook et al., 1998; Weltmeier et al., 2009). Um den Effekt des SIRT sichtbar zu machen, wurden ca. 500 bp der 5'UTR-Sequenz von allen S1 bZIP-Transkriptionsfaktoren mit einem GUS-Gen fusioniert unter der Expression eines konstitutiven UBQ5-Promotors. Bei Behandlung der Keimlinge mit Saccharose konnte eine deutliche Reduktion der GUS-Expression festgestellt werden. Über die Funktionen von bZIP1 und bZIP53 in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel ist jedoch noch nicht viel bekannt, jedoch sprechen diese Daten dafür, dass bZIP1 und bZIP53 auch in der transkriptionellen und metabolischen Anpassung der Pflanze an Salzstress involviert sind.

3.4 Zielsetzung

Die Anpassung der Pflanze an Salzstress ist auf Grund der zunehmenden Versalzung der Böden wichtig für die Landwirtschaft. Obwohl die Wurzeln der Pflanzen als erstes mit dem Salzstress in Berührung kommen, ist noch nicht viel über Signaltransduktionswege in Wurzeln zur Anpassung der Pflanze an Salzstress bekannt. Daher sollen die

Experimente dieser Arbeit in der Wurzel durchgeführt werden. Es ist bekannt, dass die Expression der Transkriptionsfaktorgene *bZIP1* und sein nah verwandter *bZIP53* nach Salzstress gewebespezifisch in den Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* und nicht im Blatt induziert werden. Wie die Transkription von *bZIP1* nach Salzstress aktiviert wird und welche Faktoren zudem Einfluss auf die salzinduzierte *bZIP1* Aktivierung haben, soll hier untersucht werden. Da ABA eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion nach abiotischen Stress spielt, soll überprüft werden, ob auch *bZIP* von ABA abhängig ist, dafür eignen sich qRT-PCR-Analysen mit Mutanten des ABA-SnRK2-AREB-Signatransduktionswegs. Die *gin2*-Mutante soll ebenfalls untersucht werden, da bereits in Versuchen mit Glukose gezeigt werden konnte, dass eine Abhängigkeit zwischen der HEXOKINASE1 und der *bZIP1*-Transkription besteht. Auch dass die Transkription von *bZIP1* von den SnRK1-Kinasen KIN10 und KIN11 beeinflusst wird, ist bekannt. Daher ist es von Interesse auch diese auf eine Funktion in der salzinduzierten *bZIP1*-Induktion zu überprüfen. Zudem soll die Rolle von Ca^{2+} , als bekannten second messenger, mittels Chemikalien, die die Ca^{2+} -Mengen in der Zelle beeinflussen, untersucht werden. Gleichzeitig soll herausgefunden werden, ob diese Wege abhängig voneinander die *bZIP1*-Transkription regulieren. Es konnte gezeigt, dass im Blatt unter Energiemangelbedingungen durch Dunkelinduktion *bZIP1* und *bZIP53* direkt an die Promotoren von ASN1 (ASPARAGIN SYNTHETASE 1) und PRODH1 (PROLINE DEHYDROGENASE 1), die im Aminosäuremetabolismus eine Rolle spielen, binden. Ob die Transkriptionsfaktoren in der Wurzel an der metabolischen Anpassung an Salzstress beteiligt sind, soll nun hier gezeigt werden. Daten einer bereits in meiner Diplomarbeit durchgeführten Microarrayanalyse (Hartmann, 2009), die mit Material von salzinduzierten Wildtyp- und *bzip1/bzip53* -Wurzeln durchgeführt wurde, sollen Aufschluss über mögliche Zielgene und die Funktionen von *bZIP1* und *bZIP53* geben, deren Expression nochmal in qRT-PCR überprüft werden soll. Da sich unter den differentiell regulierten Genen auch bekannte ABA-responsive Gene befinden, soll ein Expressionsprofil dieser Gene erstellt werden, um ein mögliches Zusammenspiel zwischen dem *bZIP1*-Signaltransduktionswegs und dem ABA-SnRK2-AREB-Signaltransduktionswegs zu analysieren.

4 Material

4.1 Organismen

4.1.1 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>	recA1 relA1 thi-1 DlacU 169 80(<i>lacZDM15</i>) hsdR17 ($r_k m_k +$)	(Hanahan, 1983)

4.1.2 Pflanzen

Es wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen der Ökotypen Columbia-0 und Landsberg erecta verwendet, Wildtyp und verschiedene transgene Linien:

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft
Columbia Col-0 N1092	Wildtyp	Kultursorte
Landsberg erecta Ler	Wildtyp	Kultursorte
<i>atbzip1</i> (SALK_059343)	AtbZIP1 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip10</i> (SALK_106031)	AtbZIP10 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip25</i> (SALK_119931)	AtbZIP25 Knock Out	NASC Stock Center
<i>atbzip53</i> (SALK_069883)	AtbZIP53 Knock Down	NASC Stock Center
<i>atbzip1/atbzip53</i>	AtbZIP1 Knock Out AtbZIP53 Knock Down	Katrin Dietrich
<i>atbzip10/atbzip25</i>	AtbZIP10 Knock Out AtbZIP25 Knock Out	Klaus Harter
<i>atbzip1/atbzip53/atbzip10</i>	AtbZIP1 Knock Out AtbZIP53 Knock Down AtbZIP10 Knock Out	Katrin Dietrich

<i>atbzip1/atbzip53/ atbzip10/atbzip25</i>	AtbZIP1 Knock Out AtbZIP53 Knock Down AtbZIP10 Knock Out AtbZIP25 Knock Out	Katrin Dietrich
Prom35S:AtbZIP1 L.C.2	AtbZIP1 Überexpression mit HA-Tag, pAlligator2, samenspezifisches GFP	Weltmeier et al. (2006)
<i>gin2</i>	HXK1 Knock Out	Moore et al. (2003)
<i>snrk2.2/3/6</i>	SnRK2.2 Knock Out SnRK2.3 Knock Out SnRK2.6 Knock Out	(Fujita et al., 2009)
<i>areb1/2/abf3</i>	AREB1 Knock Out AREB2 Knock Out ABF3 Knock Out	(Yoshida et al., 2010)
<i>kin10/ami-kin11</i>	ß-est induzierbare ami KIN11 in KIN10 Knock Out	Lorenzo Pedrotti (unveröffentlicht)

4.2 Nukleinsäuren

4.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pRT-101-35S-LUC	pUC ori, 35S-Promotor, LUC-Reportergen, Amp ^R	R. Töpfer
pHBTL-ΔGFP	pHBTL-sGFP-Derivat (Sheen, unveröffentlicht), Entfernung des GFP aus dem pHBTL-sGFP durch NcoI/NotI-Verdau, Klenow ‚fill in‘ und Religation, pUC ori, 35S-Promotor, Amp ^R	Heinekamp et al. (2002)
pBT10-Gal4-Luc	pUC ori, Gal4UAS, LUC-Reportergen, Amp ^R	Sprenger-Haussels and Weisshaar (2000)
p35S-GAD-GW-bZIP12	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP13	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP15	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP27	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP35	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP36	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP38	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP40	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP66	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GAD-GW-bZIP67	AD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012
p35S-GBD-GW-bZIP1	BD-Expressionvektor, 35S-Promotor, Amp ^R	Nora Wehner, 2012

4.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	5' → 3'	Zweck
ABF3 for	GTT CTC AAC CTG CAA CAC AGT GC	qPCR
ABF3 rev	TCC AGG AGA TAC TGC TGC AAC C	qPCR
AIL1 for	GGC ATC CAA CCA ACA GAG C	qPCR
AIL1 rev	GGT TCG AGT AGT TGC AGT AGT GG	qPCR
AREB1 for	CGA GTT ACA ACG AAA GCA GGC AAG	qPCR
AREB1 rev	AGA AGA TTC CTC ATC TCC GTC TCC	qPCR
AREB2 for	TGG TGG AAA TGC AGA AGA ATG AGC	qPCR
AREB2 rev	TCA CCA TGG TCC GGT TAA TGT CC	qPCR
ATMGL for	TGG TGG TGG ACA ACA CAT TCG C	qPCR
ATMGL rev	AAC CAC CAC ATC TGC TCC AAG C	qPCR
ASN1 for	ACC TGA CTG GAG TGG CTT ATA TCA GA	qPCR
ASN1 rev	TAA ATC TCT CCG TTC ACC GTG ACA AC	qPCR
BCAT2 for	CAC ATC TCT ACG CAA AAC TCT G	qPCR
BCAT2 rev	TGT GAT GCT CTT GAC GCC TC	qPCR
bZIP1 for	TCA GCG TTA AAC TCG TCG TAG CAA	qPCR
bZIP1 rev	AAC GCG GGT CTT AGA TCG GAG AAG	qPCR
bZIP2 for	TCA CCG CTC AGA TGG AGG AGC TT	qPCR
bZIP2 rev	TCC TGC ACC GTT GGA TTG AAC AAG	qPCR
bZIP9 for	CGA AAA GGT CCA GCC GGA AAC AAT	qPCR
bZIP9 rev	TCG ACC TCA TGA ACC GGG ATT ACA	qPCR
bZIP10 for	TTT TTC GGC CAT GCT GAA TCG TTC	qPCR
bZIP10 rev	TTA CTC CAA GCG CCA ACC CGT A	qPCR
bZIP11 for	GGA GCA GAG GAA ACG TAA ACG GAT	qPCR
bZIP11 rev	CCT GAG CCG TTA GAT CGT CTA GGA	qPCR
bZIP25 for	AGG AGG ATG CTC TCA AAC CGA GAA	qPCR
bZIP25 rev	CGG CTC TTA ATT GGC CTA CCT GTG	qPCR
bZIP44 for	TTC GAC GGC GTG ATG AAT CCT ATG	qPCR
bZIP44 rev	CAG CAG TAG AAG CAG AAG CCA TGA	qPCR
bZIP53 for	TGG GGT CGT TGC AAA TGC AAA CAA	qPCR
bZIP53 rev	CCG TGG CGT ACC TCG GAT CAT TAT	qPCR
DIN2 for	ACC ACC ATG TGG AAT GGA AAC TG	qPCR

DIN2 rev	TTT CGT AAG CCT TCC GGG TGT G	qPCR
FBP for	CGT TTG CAG TGC TGT TAA TAA GGC	qPCR
FBP rev	CCA CTG CTA ACC AAA GCG TTG AC	qPCR
LEA76 for	ACA AGA CGG GTG GAT TCT TG	qPCR
LEA76 rev	GTC GGA TCA GTG GTT CGA GT	qPCR
MCCA for	AGA GGC AAT GAA GAT GGA GCA C	qPCR
MCCA rev	AGG TCC TGT ATG CTT CCA GAG G	qPCR
NCED2 for	TCT CGC CAG ACG GCG TTA AAT C	qPCR
NCED2 rev	TCG TGA ATC ATC GTC GGA GTT TCG	qPCR
PPDK for	TGA GAA GGG TCA TAC CGT GAG C	qPCR
PPDK rev	ACT CCG CCT CTT TCG CAA TCT C	qPCR
RD29B for	ACT GAT CCC ACG CAT AAA GGT G	qPCR
RD29B rev	CTC GTC GGA AAG TCT TCT TCG C	qPCR
SEN1 for	CCT CAA CTG ATC TTC TCA CTG C	qPCR
SEN1 rev	CTG TCC AAG CGA CGT ATC CT	qPCR
SnRK2.2 for	TCG ACA GGA ATA TGA TGG CAA GC	qPCR
SnRK2.2 rev	TCG ATA ATC TCG TGG CTC CTG TG	qPCR
SnRK2.3 for	TCC CGC TAC CAG AAT AAG CAT ACC	qPCR
SnRK2.3 rev	TGG AAC TGG CTT CCT GTG TTG C	qPCR
SnRK2.6 for	TGT TGC TGA CCC TGC AAA GAG G	qPCR
SnRK2.6 rev	TTT GGC CCG GTT GAT CCG ATT C	qPCR
SUS4 for	AGA GCG TTT GGA TGC AAC TCT TG	qPCR
SUS4 rev	TTT GCC TTT GGC TTC AAC CCT TG	qPCR
SWEET2 for	AAC AGA GAG TTT AAG ACA GAG AGA AG	qPCR
SWEET2 rev	ATC CTC CTA AAC GTT GGC ATT GGT	qPCR
SWEET4 for	CCA TCA TGA GTA AGG TGA TCA AGA	qPCR
SWEET4 rev	CAA AAT GAA AAG GTC GAA CTT AAT AAG TG	qPCR
TAT7 for	TTG ATG CTG TCG AGG CTC TTG C	qPCR
TAT7 rev	CGC CGA TTC CGC AAT CTT CAT C	qPCR
UBQ5 for	GAC GCT TCA TCT CGT CC	qPCR
UBQ5 rev	GTA AAC GTA GGT GAG TCC A	qPCR
Oligo dT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT	RT
random namer	no- Mix aus Oligonukleotiden, aus dem alle mögli- chen Nonamer-Kombinationen hervorgehen	RT

Actin for	CGTTTCGCTTTCCTTAGTGTTAGCT	ChIP
Actin rev	AGCGAACGGATGTAGAGACTCACCTTG	ChIP
BCAT2 1 for	CGCCACCAAAGTTGCAGAGACG	ChIP
BCAT2 1 rev	GCAGCAGGGTTGAGCTCGATGT	ChIP
BCAT2 2 for	TGGAGCAAGCTTGGGTGTGGC	ChIP
BCAT2 2 rev	ACAGGAGAGCCAAACACAAGAAACGTG	ChIP
BCAT2 3 for	GTGATACGACGATACTGGAAAGGGACA	ChIP
BCAT2 3 rev	ACGTTGTGGAGATTGACAGCCACG	ChIP
BCAT2 4 for	AAAACCGGGGATGAATCTGTCTGCC	ChIP
BCAT2 4 rev	TCCTGTCTGGATACCTACGAGGACTGA	ChIP

Die aufgeführten Primer wurden von der Firma InvitrogenTM synthetisiert. Die Schmelztemperatur der Primer wird wie folgt berechnet (Bolton and McCarthy, 1962):

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 650/n$$

T_m = Schmelztemperatur,

n = Anzahl der Basen

4.3 Größenstandards

4.3.1 Protein-Größenstandard

Zur Ermittlung des Molekulargewichtes von Proteinen auf SDS-PAGEs wurde der "Page Ruler Prestained Protein Ladder"(Fermentas) verwendet.

4.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Referenz
α HA	HA- Epitoptag (AS; YPYDVP-DYA)	polyklonal, aus Kaninchen	1:600	Santa Cruz
anti Rabbit Ig	Kaninchen- Immunoglobulin	polyklonal, aus Esel, Peroxidase gekoppelt	1:10000	GE Health- care

4.5 Nährmedien und Zusätze

4.5.1 Bakterienmedien

Bezeichnung	Zusätze
dYT	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl autoklavieren
LB	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7,4 autoklavieren

4.5.2 Pflanzenmedien

Bezeichnung	Zusätze
MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962)	4,4 g/l Murashige und Skoog Medium pH 5,7 mit KOH autoklavieren
Hydroponik-Medium (Hoagland-Lösung)	1 ml Spurenelemente Lsg. (50 mM KCl, 50 mM H ₃ BO ₃ , 10 mM MnSO ₄ , 2 mM ZnSO ₄ , 1,5 mM CuSO ₄) 5 ml KNO ₃ (1M) 5 ml Ca ₂ (NO ₃) ₂ (1M) 1 ml KH ₂ PO ₄ (1M) 2 ml MgSO ₄ (1M) 1 ml Eisen-EDTA (72 mM FeCl ₃ , 72 mM EDTA) mit H ₂ O auf 1 l auffüllen autoklavieren

4.5.3 Medienzusätze

4.5.3.1 Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin	100 µg/ml	100 mg/ml in H ₂ O

4.5.3.2 Agar

Festmedien Bakterien	12 g/l Kobe-Agar
Festmedien Pflanzen (Hydroponik, Keimungstest)	8 g/l Gelrite

Der Agar wird nach dem Einstellen des pH-Wertes, aber vor dem Autoklavieren dazugegeben.

4.5.3.3 Sonstige Zusätze

Substanz	Endkonzentration
Abscisinsäure (ABA)	10 μM
Lanthanclorid (LaCl_3)	500 μM
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM, 250 mM, 450 mM
N-(6-Aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W-7)	100 μM

4.6 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben werden alle Lösungen und Puffer mit ultra pure H_2O angesetzt und anschließend autoklaviert (15 min, 2 bar, 121 °C).

Bezeichnung	Zusätze
35 % Percoll (ChIP)	35 % Percoll 0,5 M Hexylenglycol 50 mM PIPES-KOH pH 7,2 10 mM MgCl_2 1 % Triton X-100 mit H_2O auf 50 ml auffüllen vor Gebrauch 5 mM β -Mercaptoethanol zugeben
CI-Mix	Chloroform Isoamylalkohol (24:1)
Crosslinkingpuffer (ChIP)	50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,8 1 % Formaldehyd
DEPC-Wasser	1 l steriles H_2O 0,1 % [w/v] Diethylpyrocarbonat in H_2O Inkubation über Nacht

	autoklavieren
Elutionspuffer (ChIP)	0,1 M Glycin pH 2,5 mit HCl 500 mM NaCl 0,05 % Tween20 auf 50 ml mit H ₂ O auffüllen
Enzymlösung (Protoplasten)	1,25 % Cellulase 0,3 % Macerozym 0,4 M Mannitol 0,02 M KCl 0,02 M MES 0,01 M CaCl ₂ mit bidestilliertem H ₂ O auffüllen steril filtrieren
Extraktionspuffer (ChIP)	1 M Hexylenglycol 50 mM PIPES-KOH pH 7,2 10 mM MgCl ₂ mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen vor Gebrauch 5 mM β -Mercaptoethanol zugeben 1 Tablette Protease Inhibitor auf 10 ml
Fällungspuffer (RNA-Extraktion)	1,2 M NaCl 0,8 M tri-Natrium-Citrat
Glycinlösung (ChIP)	50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 5,8 0,3 M Glycin
Gradientenpuffer (ChIP)	0,5 M Hexylenglycol 50 mM PIPES-KOH pH7,2 10 mM MgCl ₂ 1 % Triton X-100 mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen vor Gebrauch 5 mM β -Mercaptoethanol zugeben
Harnstoffextraktions- puffer (Protein-Extraktion)	4 M Harnstoff 16,6 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol 5 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Bromphenolblau

Laufpuffer (1x) (SDS-PAGE)	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % [w/v] SDS
Ladepuffer für Agarosegele	10 ml TBE 10 ml Glycerin (87 %) 0,2 % [w/v] Bromphenolblau 0,2 % [w/v] Orange G 0,2 % [w/v] Xylencyanol
MEN-Puffer (10x) (RNA-Gele)	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH einstellen
MMG-Puffer (Protoplasten)	0,4 M Mannitol 0,015 M MgCl ₂ 0,004 M MES mit bidestilliertem Wasser auffüllen
PCI-Mix (ChIP)	Phenol Chloroform Isoamylalkohol (25:24:1) pH 7,6 - 8,0
PEG 40 % (Protoplasten)	40 % [w/v] PEG4000 0,1 M CaCl ₂ 0,2 M Mannitol mit bidestilliertem Wasser auffüllen steril filtrieren
RipaF (ChIP)	50 mM HEPES / NaOH pH7,4 140 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0 1 % Triton X-100 0,1 % DOC (sodium deoxycholate) 0,1 % SDS auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen
RNA-Probenpuffer (2,5x)	20 % [v/v] MEN

(RNA-Gele)	8 % [v/v] Glycerin 56,7 % [v/v] Formamid 5 % [v/v] Formaldehyd 0,001 % [w/v] Bromphenolblau 0,1 % [v/v] Ethidiumbromid 4 mM EDTA pH 7,5
Sammelgel (8 %) (SDS-PAGE)	0,83 ml 30 % Acrylamid / BIS-Mix (19:1) 0,63 ml 1 M Tris / HCL pH 6,8 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,005 ml TEMED 3,4 ml H ₂ O
Sonic-Puffer (ChIP)	10 mM Tris / HCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0 auf 50 ml mit H ₂ O auffüllen
Sonic-Puffer 0,25 % SDS (ChIP)	10 mM Tris / HCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0 0,25 % SDS auf 50 ml mit H ₂ O auffüllen
Sonic-Puffer 0,5 % SDS (ChIP)	10 mM Tris / HCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0 0,5 % SDS auf 50 ml mit H ₂ O auffüllen 1 Protease Inhibitor Tablette auf 10 ml
Trenngel (12 %) (SDS-PAGE)	8 ml 30 % Acrylamid / BIS-Mix (19:1) 5 ml 1,5 M Tris / HCL pH 8,8 0,2 ml 10 % SDS 0,2 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED 6,6 ml H ₂ O
Transferpuffer (Western-Blot)	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol

	0,01% (w/v) SDS
Trizolpuffer (RNA-Extraktion)	380 ml/l Phenol mit 0,1 M Citrat-Lsg. gesät. 0,8 M Guanidiniumthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 33,4 ml/l 3 M Na-Acetat pH 5 mit Essigsäure 5 % [v/v] Glycerin
W5-Puffer (Protoplasten)	154 mM NaCl 125 mM CaCl ₂ 5 mM KCl 2 mM MES mit bidestilliertem Wasser auffüllen steril filtrieren
WI-Puffer (Protoplasten)	0,5 M Mannitol 0,02 M KCl 4 mM MES mit bidestilliertem Wasser auffüllen steril filtrieren

4.7 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VE-100	Systec
Automatische Pipetten	1000, 200, 20, 10, 2 Pipet-Lite	Rainin
Digitalkamera	D-3100	Nikon
Eismaschine	D-100	Icematic
Fluorimeter	Fluoreskan Ascent	Labsystems
Gefriertruhe -80°C	C66085	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage		INTAS
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt der Universität Würzburg

Heizblock	Mixing Block MB-102	BIOER
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Inkubationsschrank		WTC Binder
Klimaschrank		Percival Scientific
Kühlschränkenke		Liebherr
Kühlzentrifuge		Eppendorf
Netzgeräte	PS305	Life Technologies
PCR-Gerät, MiniCycler™	PTC-150	MJ Research, USA
pH-Meter	HI9321	InoLab
Polyacrylamid-Gelkammer		AGS
Real-Time-PCR	CFX96, Thermal Cycler C1000	Biorad
RNA-/ DNA-Calculator	Nano Drop 2000	
Scanner		Epson
Schüttler	Orbitron	INFORS HT
Schwingmühle	MM 301	Retsch
Semi-Dry-Blot-Apparatur		Werkstatt der Universität Bielefeld
Sterilbank	B200-18	CEAG ENVIRCO
Tischzentrifuge	5417C	Eppendorf
Vakuumpumpe		
Vortex	Vortex- Genie 2	Neo Lab
Waagen		Kern
Feinwaage		Kern
Wasseraufbereitungsanlage		Millipor
Wasserbad	1086	GFL
Zentrifuge, Ausschwingrotor	Universal 16 A	Hettich

4.8 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Fließpapier	Whatman
Gläser	Weck
Glasmaterialien: Flaschen, Pasteurpipetten, Erlenmeyerkolben usw.	Brand, Schott
Handschuhe	Meditrade
Haushaltsfolie	Tip
Immobilon-P, PVDF-Transfer Membranen	Millipore
Kunststoff-Einwegmaterial: Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Röhrchen, Petrischalen usw.	Eppendorf, Brand, Sarstedt
Leukopor-Band	BSN medical
Microtiterplatten	Nunc, Sarstedt
Parafilm N	American National CanTM
Röntgenfilme	Kodak
Stahl-Netz 0,063 mm	Pressel

4.9 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	SeaKem LE Biozym
Ampicillin	Duchefa
Chloroform	Roth
dNTPs	Fermentas
EDTA	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethanol absolut	Merck
Gelrite	Roth
Iso-Propanol	Roth
Harnstoff	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kobe-Agar	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem
Magermilchpulver	Glücksklee

Mannitol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumlaurylsulfat	Roth
Orange G	Sigma
Polyethylenglycol 4000	Roth
Pepton	Roth
Phenol	Sigma
Röntgenfilm Entwickler LX24	Kodak
Röntgenfilm Fixierer AL4	Kodak
Salzsäure	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamidin)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Roth
Tween	Sigma
β -Mercaptoethanol	Roth

4.10 Enzyme

Enzym	Hersteller
Cellulase Onitsuka R-10	Serva
Macerocym R-10	Sigma
Bio-Taq Polymerase	Bioline
RevertAid TM H Minus M-MuL Reverse Transkriptase	MBI Fermentas
DNase I	Fermentas

4.11 Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin [®] Plasmid QuickPure	Macherey Nagel
NucleoBond [®] Xtra Midi	Macherey Nagel
NucleoBond [®] Xtra Maxi	Macherey Nagel
Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	Qiagen
Rneasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen

4.12 Computerprogramme

Computerprogramme und Internetanwendungen	Hersteller / Referenz
Office 2010	Microsoft
Map Man	Nagel et al. (2005)
R-Studio	RStudio, Inc.
L ^A T _E X	http://www.texshop.org
Quantprime	http://www.quantprime.de
MyIQ	BioRad
Geneious	http://www.geneious.com

5 Methoden

5.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

5.1.1 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana*-Samen für die Anzucht in Hydroponik oder auf MS-Platten

Für eine sterile Anzucht von *Arabidopsis thaliana* werden die Samen zunächst oberflächensterilisiert, um eine Kontamination des Mediums auf den Platten bzw. in den Hydroponiken zu vermeiden.

- Samen bis zu 0,5 cm Füllhöhe in ein 2 ml Reagiergefäß füllen
- unter dem Abzug flaches Weckglas mit 100 ml 12 %iger Natriumhypochlorit-Lösung in den Exsikkator stellen
- Reagiergefäße öffnen und mit einem Kunststoffständer auf das Weckglas stellen
- 5 ml HCl (37 %) zu der Natriumhypochlorit-Lösung geben
- Exsikkator verschließen
- nach ca. 4 h Inkubation unter der Sterilbank öffnen, Samen ausdampfen lassen
- sterile Samen innerhalb einer Woche auslegen

5.1.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Hydroponik

Das Protokoll für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Hydroponik stammt von Markus Teige (Universität Wien) und wird hier in abgewandelter Form angewandt.

- Spitzenkästen der Firma Greiner Bio One (1000 µl) mit Alufolie lichtdicht verpacken
- vier bis sechs 0,5 ml Reagiergefäße (Sarstedt) durch die Alufolie in die Spitzenhalterung stecken
- Kisten mit Deckel autoklavieren
- 0,5 ml Reagiergefäße mit ca. 700 µl 0,5 x MS-Medium (mit Gelrite) befüllen
- darauf jeweils zwei der zuvor oberflächensterilisierten Samen auslegen
- Deckel verschließen und mit Parafilm fixieren
- Anzucht in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit)

- nach 14 Tagen
 - Pflanzen vereinzeln
 - Spitze der 0,5 ml Reagiergefäße abschneiden
 - 400 ml Hoaglandlösung in die Spitzenkästen geben
- Kästen wieder in Klimakammer stellen
- nach 12 Tagen Deckel der Kästen entfernen
- nach weiteren 14 Tagen Stress applizieren und Pflanzen ernten



Abbildung 5.1: *Arabidopsis thaliana*-Anzucht in Hydroponikkultur

5.1.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf MS-Platten

- Sterile Samen auf MS-Platten ausstreuen
- Platten mit Leukopor verschließen
- zwei bis vier Tage bei 4 °C stratifizieren

Die Pflanzen werden unter Langtagbedingungen in einer Klimakammer angezogen, wobei die Platten senkrecht gestellt werden, damit man die Keimlinge später besser ernten kann.

5.1.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Die oberflächensterilisierten Samen werden auf Minimal-Erde ausgelegt. Die Erde wird zuvor für 30 min bei 90 °C autoklaviert, um Pilze und Sporen abzutöten.

Die Anzucht der Pflanzen findet in einem Pflanzenschrank für Samennachzucht unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bzw. für Protoplastengewinnung unter 12/12 Bedingungen (12 h Licht, 12 h Dunkelheit) statt.

5.2 Abiotische Stressbedingungen für Pflanzen

5.2.1 Zur Auswertung in qPCR

5.2.1.1 Hydroponik

Den Pflanzen, die in den Hydroponiken gewachsen sind, werden am Tag der Ernte jeweils verschiedene abiotische Stresse durch Zugabe von Chemikalien in die Hoaglandlösung zugefügt:

- 10 μM ABA
- 150 mM KCl
- 360 mM Mannitol
- 100 mM MgCl_2
- 150 mM NaCl
- 100 mM Na_2SO_4

Die Pflanzen werden, Wurzel und Blatt getrennt voneinander, nach der Stresszugabe zu verschiedenen Zeitpunkten gleichzeitig zum Zeitpunkt „0 h“ geerntet.

5.2.1.2 MS-Platten

Oberflächensterilisierte Samen werden auf MS-Platten ausgelegt, stratifiziert und für drei Wochen senkrecht unter Langtagbedingungen im Pflanzenschrank angezogen. Der Stress wird am Tag der Ernte appliziert:

- 250 bzw. 450 mM NaCl
- 500 μM LaCl_3
- 10 μM W7
- 5,5 mM, 27,5 mM, 55 mM Glucose
- 5,5 mM, 27,5 mM, 55 mM Mannitol

jeweils gelöst in 6 ml (runde Platten) bzw. 8 ml (eckige Platten) H_2O .

Bei durch β -Estradiol induzierbaren Pflanzen werden die Samen zunächst zwei Wochen auf MS-Medium angezogen, danach für eine Woche auf Medium mit 10 μM β -Estradiol überführt.

5.2.2 Für Phänotypen-Bestimmung

Die Samen werden mit einer Schablone gleichmäßig auf quadratischen MS-Platten ausgelegt, die kein bzw. eine Konzentration von 175 mM NaCl enthalten. Die Platten werden zwei Tage bei 4 °C stratifiziert, dann in einen Klimaschrank mit Langtagbedingungen gelegt und nach zehn Tagen ausgewertet.

5.2.3 In Protoplasten

Bei der Protoplastentransformation wird dem WI-Puffer NaCl mit einer Endkonzentration von 125 mM zugesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht.

5.3 Kultivierung und Transformation von *Escherichia coli*

5.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur sterilen Anzucht von *Escherichia coli* werden die benötigten Stämme in flüssigem oder festem LB- bzw. SOC-Medium mit dem Stamm entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C inkubiert (Sambrook and Russell, 2001). Nach 12-16 Stunden Inkubation befindet sich die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase und kann direkt für weitere Experimente verwendet werden. Sie kann aber auch bei 4 °C oder nach Zugabe von 1/2 Volumen Glycerin bei -80 °C für einige Tage bzw. mehrere Jahre konserviert werden.

5.3.2 Herstellung kompetenter Zellen von *Escherichia coli*

Trotz der noch nicht geklärten Mechanismen zur Kompetenzentwicklung bei *E. coli* gibt es verschiedene Verfahren um transformationskompetente Zellen herzustellen. In den meisten Versuchen wurde dazu der Stamm DH5 α verwendet. Die kompetenten Zellen werden dabei nach einem modifizierten Protokoll (Inoue et al., 1990) hergestellt:

- 0,8 ml einer Übernachtskultur in 40 ml LB-Medium überimpfen
- Anzucht der Kultur bis zum Erreichen einer OD600 von 0,5
- je 10 ml der Kultur in 50 ml Röhrchen überführen
- 5 min, 6000 g, 4 °C abzentrifugieren
- Pellet in 5 ml 50 mM CaCl₂ (4 °C) resuspendieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 5 min, 6000 g, 4 °C abzentrifugieren
- Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂ (4 °C) und 0,4 ml 87 % Glycerin aufnehmen
- Aliquotieren (je 200 μ l) in 1,5 ml Reagiergefäßen
- in flüssigem Stickstoff schockgefrieren
- die Aufbewahrung erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C

5.3.3 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage, DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit folgender Methode werden *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert (Hanahan, 1983).

- Kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis auftauen
- DNA zugeben, vorsichtig mischen
- mindestens 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock für 60 s bei 42 °C
- 500 µl LB- oder DYT Medium zugeben
- 30 min bei 37 °C schütteln
- kurz abzentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet im Rückfluss resuspendieren
- Lösung auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum austreichen und bei 37 °C über Nacht inkubieren

5.4 RNA

5.4.1 RNA-Extraktion aus *Arabidopsis thaliana*

5.4.1.1 mit Trizol

Diese Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform-Extraktion. Die RNA kann hier sehr gut extrahiert werden, da sie sich in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, wohingegen sich andere Zellbestandteile besser in Chloroform lösen. Durch die Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer werden RNasen inhibiert und eine Degradation der RNA verhindert (Chomczynski, 1993; Chomczynski and Sacchi, 1987).

- Pflanzenmaterial (Wurzel oder Blatt) in flüssigem Stickstoff aufmörsern und ca. 100 mg Material in ein 2 ml Reagiergefäß abfüllen
- 1 ml Trizolpuffer zugeben
- Gefäß auf dem Vortexer fixieren und 5 min schütteln
- 0,2 ml Chloroform zugeben
- erneut 5 min schütteln
- 30 min bei 4 °C und 12000 g abzentrifugieren
- wässrigen Überstand (ca. 650 µl) abnehmen und in ein neues 2 ml Reagiergefäß überführen
- jeweils 0,25 ml Iso-Propanol und RNA-Fällungspuffer zugeben
- invertieren und 10 min bei RT inkubieren

- 15 min bei 4 °C und 12000 g abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Pellet in 0,25 ml 70 % EtOH waschen
- 5 min bei 4 °C und 12000 g abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und verwerfen
- Pellet für 15 min bei RT trocknen
- Pellet in 20-50 µl DEPC H₂O aufnehmen und bei RT schütteln

5.4.1.2 mit RNeasy Plant Mini-Kit[®]

In das RNeasy Plant Mini-Kit[®] von Qiagen werden ca. 100 mg Pflanzenmaterial eingesetzt. Die RNA-Extraktion erfolgt nach Protokoll. RNA-Proben für die Microarray-Analyse wurden mit dem RNA-Kit extrahiert.

5.4.2 RNA-Gel

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wird eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In dem Gel werden die RNA-Moleküle nach Größe aufgetrennt.

- 1,5 g Agarose in 112,5 ml H₂O aufkochen
- unter Rühren auf ca. 60 °C abkühlen lassen
- 15 ml 10x MEN-Puffer zugeben
- 22,5 ml 37 % Formaldehyd zugeben

Als Laufpuffer wird 1x MEN eingesetzt. Ca. 0,5 µg RNA werden mit 10 µl RNA-Ladepuffer (2,5x) versetzt und 5 min bei 65 °C aufgeköcht. Nach kurzem Abzentrifugieren der Proben werden diese auf Eis gelagert. Das Gel läuft ca. 1,5 h bei 300 V.

5.5 Reverse Transkriptase-PCR zu Herstellung von cDNA

Die extrahierte mRNA kann mit Hilfe der RT-PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, die dann in die Real-Time-PCR eingesetzt werden kann. Mit dieser Methode kann die Menge eines bestimmten Transkripts in einer Probe bestimmt werden.

Die Reverse Transkriptase verlängert die an die RNA gebundenen Primer in 3'-Richtung. Es wird zum einen ein Random-Nonamer-Primer zugegeben, der zufällig an komplementären Stellen in der mRNA bindet. Zum anderen wird ein Oligo-dT-Primer verwendet, der spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNAs bindet. In dieser Reaktion werden spezifisch alle mRNAs in cDNA umgewandelt.

- 1 µg RNA in 8 µl DEPC-H₂O mit je 1 µl DNase und DNase-Puffer versetzen
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- 1 µl EDTA zugeben
- 10 min bei 65 °C inkubieren
- 1 µl Random-Nonamer-Primer (200 µM) und 0,2 µl Oligo-dT-Primer (10 µM) zugeben
- 10 min bei 70 °C inkubieren
- auf Eis 4 µl RT-Puffer, 2 µl dNTPs und 0,25 µl Reverse Transkriptase zugeben
- 70 min bei 42 °C, dann 10 min bei 70 °C inkubieren
- Lagerung bei 4 °C

5.6 Quantitative Real-Time-PCR

Mit der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) können kleine Mengen DNA in Echtzeit amplifiziert und quantifiziert werden.

Die Quantifizierung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz des Fluorophors SybrGreen. SybrGreen bindet ausschließlich an doppelsträngige DNA. Der dabei entstehende SybrGreen-DNA-Komplex absorbiert dann blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht bei 521 nm. Je mehr doppelsträngige DNA gebildet wird, desto stärker ist also die Fluoreszenz. Ist mehr Template zu Beginn dieser Reaktion vorhanden, werden weniger Zyklen benötigt, um ein über dem Hintergrund liegendes Fluoreszenz-Signal zu erhalten (Gibson et al., 1996). Dieser Punkt wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) definiert und liegt immer in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Mit diesem Schwellenwert kann man die Proben untereinander vergleichen. Ein hoher Ct-Wert bedeutet in diesem Fall, dass viele Zyklen zum Erreichen des Schwellenwerts nötig waren, und somit eine geringe Menge DNA, während ein niedriger Ct-Wert auf eine größere Menge spezifische cDNA hindeutet. Mit Hilfe von spezifischen Primern lassen sich so die Transkriptmengen spezieller Gene quantitativ bestimmen.

Da das System sehr sensitiv ist, werden Kontrollen mitgeführt. Es wird stets ein Primerpaar für ein Haushaltsgen eingesetzt, das immer gleich stark induziert sein sollte. Bei den hier durchgeführten Salzstress-Experimenten wurde das Haushaltsgen *Ubiquitin 5 (UBQ5)* verwendet. Außerdem wird für jedes Primerpaar eine non template control (NTC) angesetzt, in der sich keine cDNA als Template befindet, und in der somit keine oder kaum Produktbildung detektierbar sein sollte.

Protokoll zur Durchführung einer Real Time-PCR-Analyse:

- Master-Mix ansetzen (pro Reaktion)
 - 16,45 µl H₂O

- 2,5 µl Puffer Bioline (10x)
 - 1 µl MgCl₂ Bioline (50 mM)
 - 0,25 µl dNTPs (10 mM)
 - 2,5 µl Primer-Mix (10 µM)
 - 0,25 µl SybrGreen
 - 0,05 µl BIOTaq DNA Polymerase (5 U/µl)
- 23 µl Master-Mix in jedes Reaktionsgefäß geben
 - 2 µl der 1:20 verdünnten cDNA zugeben
 - mischen und kurz abzentrifugieren
 - PCR-Programm starten

SybrGreen unterscheidet nicht zwischen unterschiedlichen doppelsträngigen DNA-Abschnitten, daher ist es wichtig eine Schmelzkurve zur Überprüfung der Primerspezifität zu erstellen. Am Ende der PCR wird die Temperatur langsam in 0,5 °C-Schritten erhöht. Die DNA-Doppelstränge trennen sich am Schmelzpunkt und die Fluoreszenz sinkt rapide.

Die PCR-Produkte eines Primer-Paares sollten identisch sein, also den gleichen Schmelzpunkt haben. Sollte die Schmelzkurve mehrere Maxima haben, kann man z.B. auf Kontaminationen oder unspezifische Bindungen schließen. Das Ergebnis kann ausgewertet werden, wenn die Schmelzkurve nur ein Maximum hat. Die Ct-Werte der einzelnen Proben, werden untereinander verglichen und zusätzlich noch über den UBQ5-Wert abgeglichen.

5.7 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5.7.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA werden die *E. coli*-Stämme in 4 ml-Kulturen mit dYT-Medium und den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Extraktion erfolgt dann mittels des NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure-Minikits von Macherey-Nagel laut Protokoll des Herstellers. Mit dieser Methode können DNA-Ausbeuten von bis zu 400 ng/µl erreicht werden.

5.7.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um eine hohe und besonders reine Ausbeute an Plasmid-DNA zu erreichen, wie sie für Protoplastentransformation benötigt wird, wird die Midi-Präparation durchgeführt. Dazu werden die *E. coli*-Stämme in 200 ml dYT über Nacht inokuliert. Die Präparation

erfolgt dann mit dem NucleoBond[®] Xtra Midi-Kit von Macherey-Nagel, nach dem Protokoll des Herstellers.

5.7.3 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um höhere Ausbeuten an Plasmid-DNA zu erreichen, wird die Maxi-Präparation durchgeführt. Dazu werden Vorkulturen der *E. coli* -Stämme in 5 ml dYT mit Zusätzen über Tag angezogen, mit welchen Übernachtskulturen in 600 ml dYT inokuliert werden. Die Präparation erfolgt dann mit dem NucleoBond[®] Xtra Maxi-Kit von Macherey-Nagel, nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers. So werden als Modifikation die Säulen zweimal nacheinander zur Bindung und Elution desselben Plasmids verwendet.

5.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmungen der Konzentrationen von gelösten Nukleinsäuren werden mit dem NanoDrop (Thermo scientific) durchgeführt. Dazu wird 1 µl der Lösung auf den Messpunkt pipettiert. Konzentrationsberechnungen führt das Gerät automatisch durch.

5.8 Western-Blot Analyse

5.8.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Pflanzen

Proteinextrakte können aus Pflanzenmaterial mittels einer Extraktion mit Harnstoffextraktionspuffer gewonnen werden.

- Pflanzenmaterial (Wurzel oder Blatt) in flüssigem Stickstoff aufmörsern
- Gleiche Mengen Material (50- 200 mg) in 1,5 ml Reagiergefäß einwiegen
- 150 µl Harnstoffextraktionspuffer zugeben
- gut mischen
- 10 min bei 80 °C im Thermomixer inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm bei RT die Zelltrümmer abzentrifugieren
- Überstand in neues Reagiergefäß überführen
- Proteinextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C lagern
- Vor Auftragung der Proben in der SDS-PAGE 5 min bei 65 °C inkubieren
- Proben können direkt auf das Gel aufgetragen werden

5.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, (Laemmli, 1970)) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Die Polyacrylamidmatrix wird

durch Polymerisation von Acrylamid mit dem Quervernetzer N,N'-Methylbisacrylamid (BIS) hergestellt. Die Porengröße im Gel kann durch die Wahl der Acrylamidkonzentration sowie des Verhältnisses von Acrylamid und BIS verändert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) durch Erzeugung freier Radikale gestartet. Als Katalysator wird N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugefügt.

In dieser Arbeit werden SDS-Gele mit einem 5 %igem Sammelgel und 12 %igem Trenngel verwendet (siehe Material). Die Taschen des Gels werden mit 40 µl Protei-
nextrakt aus denaturierten Harnstoffextrakten beladen. Der Gellauf erfolgt bei 140 V für etwa 2 h. Um spezifisch ein über ein SDS-Gel aufgetrenntes Protein nachzuweisen, werden die Proteine zunächst auf eine hydrophobe PVDF-Membran geblottet (Towbin et al., 1992; Burnette, 1981), bevor mit Hilfe eines spezifischen Antikörpersystems die Detektion des Proteins erfolgt.

5.8.3 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine werden mittels der „Semi-Dry-Blotting“- Methode (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine PVDF-Membran transferiert:

- drei Lagen Whatman-Fließpapier in Transferpuffer anfeuchten und auf die Blotting-Apparatur auflegen
- die PVDF-Membran in Methanol aktivieren, mit Transferpuffer äquilibrieren und luftblasenfrei auf das Fließpapier legen
- das Gel auf der Membran positionieren
- drei Lagen in Transferpuffer äquilibriertes Fließpapier auflegen
- Deckel der Blotting-Apparatur auflegen und beschweren
- der Elektrotransfer erfolgt für 1 bis 1,5 h bei 1 mA/cm² Filterfläche.

5.8.4 Immunodetektion mit dem ECL-System

Bei der hier angewandten indirekten Nachweismethode werden die auf der Membran immobilisierten Proteine zuerst mit einem Primärantikörper immunodetektiert. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen ein Epitop des nachzuweisenden Proteins gerichtet. Unter Verwendung eines mit einer Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörpers wird der Primärantikörper erkannt. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe des ECL+-Kits der Firma Amersham. Nach Inkubation des Filters mit einem Substrat-Mix kann die bei der Peroxidase-katalysierten Oxidation des Substrates Luminol entstehende Chemilumineszenz durch Exposition eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

- Filter 5 min in TBST äquilibrieren

- 60 min Inkubation in 5 % Milchpulver in TBST (Blocken freier Stellen auf der Membran)
- Inkubation in 1 % Milchpulver in TBST und Primärantikörper ü.N. oder mindestens für 2 h
- Membran zweimal 5 min in TBST mit 1 % Milchpulver waschen
- Membran zweimal 5 min in TBST waschen
- Inkubation in 1 % Milchpulver in TBST und Sekundärantikörper für 2 min
- Membran 5 Mal 5 min in TBST waschen
- den ECL-Substratmix frisch aus Lösung A und Lösung B herstellen (1:1)
- die Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Klarsichtfolie legen und mit dem Substratmix 5 min bei RT inkubieren
- überschüssigen Substratmix entfernen
- eine zweite Klarsichtfolie darauf legen

Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt durch Exposition eines Röntgenfilms, je nach Signalstärke für 3 s bis 20 min, der dann für 1-5 min entwickelt, kurz gewässert und 3 s fixiert wird.

5.9 Transiente Protoplasten-Transformation in *Arabidopsis thaliana*

Um Studien zur transienten Genexpression durchführen zu können, eignen sich *Arabidopsis* Mesophyll- und Wurzelprotoplasten. Außerdem kann in diesem System auch der Einfluss von vielen Stressbedingungen (wie z.B. Salz) auf die Genexpression verschiedener Reportergene getestet werden.

5.9.1 Gewinnung von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten

- Blätter von drei bis vier Wochen alten Pflanzen ohne Blütenansatz, die unter Langtagbedingungen angezogen wurden, auf der Blattunterseite fein mit einem Skalpell einritzen
- Blätter mit der Blattunterseite nach unten auf 10 ml Enzymlösung in eine Petri-schale legen, ohne dass Luftblasen entstehen
- der Zellwandverdau erfolgt über Nacht im Klimaschrank
- nach dem Verdau der Zellwand durch die Enzymllösung, Protoplasten durch leichtes Schwenken herauslösen
- Protoplasten durch ein vorher mit W5-Puffer befeuchtetes Metallnetz (0,063 mm) vorsichtig in ein 50 ml Röhrchen filtrieren

- 2 min bei 100 g bei RT zentrifugieren; Beschleunigen und Abbremsen erfolgt langsam, damit die Protoplasten intakt bleiben
- Überstand mit abgeschnittener blauer Spitze entfernen
- vorsichtig mit gekühlter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen
- durch leichtes Schwenken vorsichtig resuspendieren
- 1 min bei 100 g bei RT zentrifugieren; langsam beschleunigen und abbremsen
- Überstand mit abgeschnittener blauer Spitze entfernen
- vorsichtig mit gekühlter W5-Lösung auf 10 ml auffüllen
- durch leichtes Schwenken Protoplastenpellet vorsichtig resuspendieren
- 5 h auf Eis stellen

Die Gewinnung von Wurzelprotoplasten geschieht mit geringen Modifikationen

- Wurzeln von auf MS-Platten angezogenen 2 Wochen alten Keimlingen ernten
- in 20 ml Enzymlösung in kleinem Erlenmeyerkolben für ca. 3 h schwenken
- 10 min bei 100 g bei RT zentrifugieren; Beschleunigen und Abbremsen erfolgt langsam
- Protoplasten durch ein vorher mit W5-Puffer befeuchtetes Plastiknetz (0,04 mm) vorsichtig in ein 50 ml Röhrchen filtrieren

5.9.2 PEG-Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten in Mikrotiterplatte

Um 96 Protoplastentransformationen auf einmal durchzuführen wird das Protokoll von (Wehner et al., 2011) angewandt.

- Überstand mit abgeschnittener Spitze entfernen
- Protoplasten mit gewünschter Menge MMg-Lösung versetzen und durch leichtes Schwenken resuspendieren
- In weißer Mikrotiterplatte mit Rundboden je 1 µg Plasmid-DNA pro Konstrukt und Reaktion in 4 µl Gesamtvolumen vorlegen
- Platte schräg halten und 30 µl Protoplasten-Lösung mit Multikanalpipette und weitleumigen Spitzen hinzufügen
- 33 µl PEG-Lösung mit Multikanalpipette und weitleumigen Spitzen hinzufügen, 10 mal vorsichtig auf- und abpipettieren
- 25 min bei RT inkubieren
- 20 µl W5-Lösung vorsichtig mit Multikanalpipette und weitleumigen Spitzen hinzufügen, 5 mal auf- und abpipettieren
- Mikrotiterplatte für 1 Minute bei 100 g und RT zentrifugieren (langsam beschleunigen und abbremsen)

- mit weitleumigen Spitzen 175 µl des Überstands entfernen
- 100 µl WI-Lösung zugeben, 3 mal Auf- und Abpipettieren Protoplasten resuspendieren
- Inkubation über Nacht im Klimaschrank
- Am Folgetag 80 µl Überstand entfernen
- Es folgt die jeweilige Luciferase-Messung

5.9.3 Messung der Luciferase (LUC)-Aktivität

Die Messung der Firefly-Luciferaseaktivität für das PTA-Screening-System ohne Abgleich erfolgt mit lebenden Protoplastenzellen. Zuvor müssen die Zellen 8 Minuten dunkel stehen, um die Eigenphosphoreszenz abklingen zu lassen. Anschließend werden 40 µl WI-Puffer mit 1mM Luciferin-Kalium-Salz pro Reaktion über die Injektoren des Luminometers zugegeben. Die Lumineszenzmessung erfolgt nach jeweils 15 Sekunden Integrationszeit.

5.10 Microarray

Die RNA für die Microarrayanalyse wurde mit Hilfe des Rneasy[®] Plant Mini Kit aus *Arabidopsis*-Wurzeln extrahiert und mit einem RNA-Gel überprüft. Die Messung und Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Johannes Hanson der Universität Utrecht durchgeführt.

Die Messung der Proben erfolgt nach dem wie in Hanson et al. (2008) aufgeführten Protokoll. Der Signifikanz-Schwellenwert wurde auf 0,01 gesetzt.

5.11 Metabolomanalyse

Die Metabolomanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Kempa (MPI Golm, Potsdam) durchgeführt.

Aufgemörsertes Wurzelmaterial wurde mittels Gas-Chromatographie Massenspektromie wie in Kempa et al. (2008) beschrieben, durchgeführt.

5.12 Aminosäuremessung

5.12.1 Extraktion der Aminosäuren

- 50 mg Pflanzenmaterial mit 300 µl Extraktionslösung versetzen
- vortexen

- in der Kugelmühle 10 min bei 21 Hz und RT schütteln
- 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und aufbewahren
- 300 µl Extraktionslösung zugeben
- in der Kugelmühle 10 min bei 21 Hz und RT schütteln
- 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- Überstände vereinen (ca 600 µl)
- vortexen
- 3,5 min bei 14000 rpm und RT zentrifugieren
- Überstand abnehmen

5.12.2 Derivatisierung und Messung

Für die Aminosäure-Analytik wird eine Derivatisierung der Extrakte mit AccQ-Tag (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamat) durchgeführt. Hierfür wird das AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit von Waters verwendet. Die Derivatisierung wird nach Protokoll durchgeführt.

Für die Detektion wird die negative Elektrospray-Ionisierung mit folgenden Parametern verwendet (Synapt G2 HDMS, Waters, U.K.):

- Kapillarspannung: 0,8 kV
- Quellenspannung: 25 V
- Quellentemperatur: 120 °C

Die Spektren werden im Breitbandmodus aufgenommen. Die interne Kalibrierung wird mit Leucin-Enkephalin (2 ng/µl in 50 % Acetonitril) durch eine externe Ionisierungsquelle durchgeführt. Die Kalibrierung wird alle 30 Sekunden durch Messung der Ionenintensität von Leucin-Enkephalin mittels einer zusätzlichen Ionenquelle gemessen, um die Messgenauigkeit zu korrigieren. Die Auswertung erfolgt mittels QuanLynx von Waters. Bei der Integration wird ein Chromatogramm-Massenfenster von 0.03 mDa verwendet sowie ein Retentionszeit-Fenster von 0,1 Minuten.

Die Quantifizierung wird anhand des internen Standards Norvalin mit Hilfe von Kantago (www.vertigonal.de/Kantago) durchgeführt.

5.13 Zuckermessung

5.13.1 Extraktion der Zucker

- Wurzelmaterial in flüssigem Stickstoff aufmörsern und ca. 20 mg Frischgewicht in 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäße einwiegen

- Porzellankugel zugeben und in der Kugelmühle 3 min bei 21 Hz schütteln
- 250 μ l MeOH/H₂O (50:50) und Internen Standard (je 10 μ g D2-Glucose, D2-Treahlose) zugeben
- 3 min bei 80 °C
- in der Kugelmühle 3 min bei 21 Hz schütteln
- 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- bei Bedarf Zentrifugierschritt wiederholen
- Überstand, ca. 150 μ l, in UPLC-Vials überführen

5.13.2 Messung der Zucker

Die Metabolite des Extraktes werden durch ein Waters Acquity UPLC-System unter Verwendung einer BEH Amide Säule (Porengröße 1,7 μ m, Durchmesser 2,1 x 100mm, Waters) aufgetrennt. Bei einer Temperatur von 35 °C werden die Proben analysiert. Die Auftrennung erfolgt mit Hilfe eines linearen Gradienten, bei dem innerhalb von 10 min die Konzentration des Elutionsmittels B (30 % ACN, 70 % Wasser mit 0,1 % NH₄OH) von 10 % auf 70 % bei einer Flussrate von 0,2 ml/min erhöht wird. Danach wird die Säule für 25 min mit 90 % Elutionsmittel A (80 % ACN, 20 % Wasser mit 0.1 % NH₄OH) äquilibriert.

Als Massenspektrometer wird ein Quattro Premier Triple Quadrupol von Waters verwendet. Es wird im negativen Ionisierungsmodus mit folgenden Parametern gemessen:

- Kapillarspannung: 3,25 kV
- Quelltemperatur: 120 °C
- Desolvatationstemperatur: 350 °C
- Desolvationsgasfluss: 800 l/h

Die Ionisierung der Analyten erfolgt mittels negativer Elektrospray-Ionisation. Die Detektion wird mit „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Modus durchgeführt. Die Auflösung des Massenspektrometers ist regulär auf 0,6-0,7 Dalton bei halbmaximaler Peakbreite eingestellt. Als Desolvatisierungs- und Konusgas wird Stickstoff verwendet. Die Auswertung der Messung erfolgt mittels Quan- Lynx von Waters.

5.14 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist eine Methode, mit der die *in vivo* Bindung von Proteinen an DNA gezeigt werden kann (Hecht et al., 1996; Johnson et al., 2001). In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob bZIP1 an potentielle Zielgene bindet.

5.14.1 Kreuzvernetzung der DNA-Protein-Komplexe

Die Kreuzvernetzung der DNA-Protein-Komplexe (Solomon et al., 1988; Solomon and Varshavsky, 1985) erfolgt mit Hilfe eines formaldehydhaltigen Crosslinkingpuffers.

- im Vorfeld mit NaCl behandeltes Wurzelmaterial ernten und in Nylonstrümpfe verpacken
- Proben in ein Einmachglas überführen und mit 1 l Crosslinkingpuffer (+ 1 % Formaldehyd überschichten
- Vakuum anlegen bis das Wurzelmaterial mit dem Puffer getränkt ist (2 x 6 min)
- 18 min ohne Vakuum inkubieren
- Puffer entsorgen und mit 200 ml kalter Glycinlösung durchspülen, dann 800 ml Glycinlösung auf die Proben geben
- 5 min Vakuum anlegen
- 5 min ohne Vakuum inkubieren
- Wurzelmaterial mit eiskaltem bidestilliertem Wasser waschen
- Wurzelmaterial trocken tupfen
- in flüssigem Stickstoff einfrieren und lagern

5.14.2 Isolation der Kerne

In diesem Schritt werden die Kerne von den restlichen Zellorganellen und Zelltrümmern getrennt. Die Durchführung erfolgt im Kühlraum bei 4 °C.

- Wurzelmaterial in Stickstoff sehr fein aufmörsern und in ein Stickstoff gekühltes 50 ml Röhrchen überführen
- 20 ml kalten Extraktionspuffer zugeben
- mit einem Spatel ca. 15 min homogenisieren
- durch 2 Lagen Miracloth filtrieren
- mit Extraktionspuffer auf 24 ml auffüllen
- unter langsamem Rühren 1 ml 24 % Triton X-100 tropfenweise zugeben
- 15 min weiter rühren
- 6 ml 35 % Percoll mit den 25 ml Kernen überschichten
- bei 2000 g (3500 rpm), soft stopp, 30 min bei 4 °C abzentrifugieren
- Überstand abnehmen
- Pellet in 20 ml Gradientenpuffer resuspendieren
- erneut auf 6 ml 35 % Percoll geben
- bei 2000 g (3500 rpm), soft stopp, 10 min bei 4 °C abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und die Kerne in 0,5 ml Sonic-Puffer (0,5 % SDS) aufnehmen

- in 2 ml Reagiergefäß überführen
- 20 min bei 4 °C unter leichter Schwenkbewegung auf Intellimixer inkubieren (Programm 60, 10 rpm).
- 0,520 ml kalten SonicBuffer ohne SDS dazugeben, invertieren
- je 0,520 ml in neues kaltes 1,5 ml Reagiergefäß überführen
- 20 µl für Agarose-Gelelektrophorese entnehmen und wegfrieren

5.14.3 Fragmentierung des Chromatins

Die Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung des Chromatins findet bei Cycle 1 und Amplitude 90 % für 7 x 10 s pro Probe auf Eis statt. Anschließend wird 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der das fixierte Chromatin enthält, wird in Aliquots von 200 µl bei -80 °C weggefroren.

50 µl werden aufgehoben, um die DNA-Konzentration zu bestimmen:

- Zugabe von 5 µl Proteinase K und 1 µl RNase
- 1 h Inkubation bei 42 °C
- über Nacht Inkubation bei 65 °C (Decrosslinking)

5.14.3.1 Quantifizierung der DNA

- 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zum Aliquot zugeben
- 30 s vortexen
- 10 min bei RT und 13.000 rpm abzentrifugieren
- obere wässrige Phase in neues Reagiergefäß überführen
- 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugeben
- 30 s vortexen
- 10 min bei RT und 13.000 rpm abzentrifugieren
- Überstand in neues Reagiergefäß überführen
- 20 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2), 0,6 µl Glykogen (20 mg/ml) und 500 µl kalten 96 % igen Ethanol zugeben
- invertieren
- 4 h bei -80 °C
- 90 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 900 µl 70 % Ethanol waschen
- 20 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet für 1 min bei 42 °C trocknen
- Pellet in 100 µl H₂O lösen
- Konzentrationsbestimmung am Nanodrop

- Kontrolle der Fragmentgröße von sonifizierter Probe und intaktem Chromatin auf 1 % igem Agarosegel

5.14.4 Immunopräzipitation

Die aliquotierten Chromatin-Proteinkomplexe werden nun für die Immunopräzipitation verwendet:

- Chromatin langsam auf Eis auftauen
- 5 min bei 4 °C 13.000 rpm zentrifugieren
- Mit Hilfe der zuvor bestimmten DNA-Konzentrationen für jeden Ansatz die gleiche Menge DNA (20 µg) in neues Reagiergefäß überführen
- mit Sonic-Puffer (+ 0,25 % SDS) auf 200 µl auffüllen
- 300 µl RIPAF ohne SDS zugeben, leicht mischen
- 50 µl als Input-DNA-Kontrolle abnehmen und mit 400 µl SonicBuffer + 0,25 % SDS versehen
- Probe mit 3 µl HA-Antikörper (1 µg/µl, ChIP grade) versehen
- mindestens 4 h bei 4 °C auf dem Intellimixer inkubieren (Programm C1, 10 rpm)
- 75 µl in RIPAF + SDS aufgenommene Magnetic beads zugeben
- 2 h bei 4 °C im Intellimixer inkubieren (Programm C1, 10 rpm)
- Beads mit Hilfe des Magneten an der Gefäßwand konzentrieren
- Magnetic beads mit gebundenem Antikörper und Proteinen dreimal mit 1 ml RIPAF waschen
- mit 2 x 150 µl Glycin-Elution-Buffer eluieren (Puffer auf Magnetic beads geben, vortexen, ankonzentrieren) und zusammenfügen
- restliche 300 µl Überstand direkt in 150 µl 1 M Tris-HCl pH 9,7 geben
- Decrosslinking (5 µl Proteinase K, 1 h 42 °C, dann 65 °C über Nacht)

Der Erfolg der IP wird anschließend mittels Western Blot überprüft. Dafür werden je 100 µl Überstand und Eluat mit 400 µl Aceton über Nacht gefällt, danach das Proteinpellet in Harnstoffextraktionspuffer aufgenommen und auf das SDS-Gel aufgetragen. 10 µl Ausgangschromatin werden ebenfalls mit Harnstoffextraktionspuffer versetzt und aufgetragen.

Nachdem die durch die Immunopräzipitation gewonnene DNA (auch die der Input-Kontrollen) mit einer Phenol-Chloroformfällung aufgereinigt wurde (s. Fragmentierung des Chromatins), bei der die DNA am Ende in 75 µl H₂O (bzw. 450 µl für die Input-Kontrolle) aufgenommen wird, kann sie in einer Real-Time-PCR getestet werden.

Für die Normalisierung werden neben den Primern für die Promotorregionen auch Primer verwendet, die einen Teil des Actin 7 Promotors amplifizieren. Da dieser keine bekannten Motive enthält, an die bZIP-Transkriptionsfaktoren binden dient er als

Negativ-Kontrolle und sollte in WT und bZIP-Überexpressionspflanzen gleich stark amplifiziert werden. Die Anreicherung des Promotorfragments in den Überexprimierern wird als ein Vielfaches des Wildtyps angegeben.

6 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors *bZIP1* und die des nah verwandten *bZIP53* in der *Arabidopsis thaliana* Wurzel nach Salzstress untersucht werden. Die Ergebnisse, die in drei Abschnitte unterteilt sind, zeigen, wie und wodurch *bZIP1* in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel induziert wird, an welchen transkriptionellen und metabolischen Anpassungen *bZIP1* nach Stress beteiligt ist und wie zwei Signaltransduktionswege miteinander verknüpft sind.

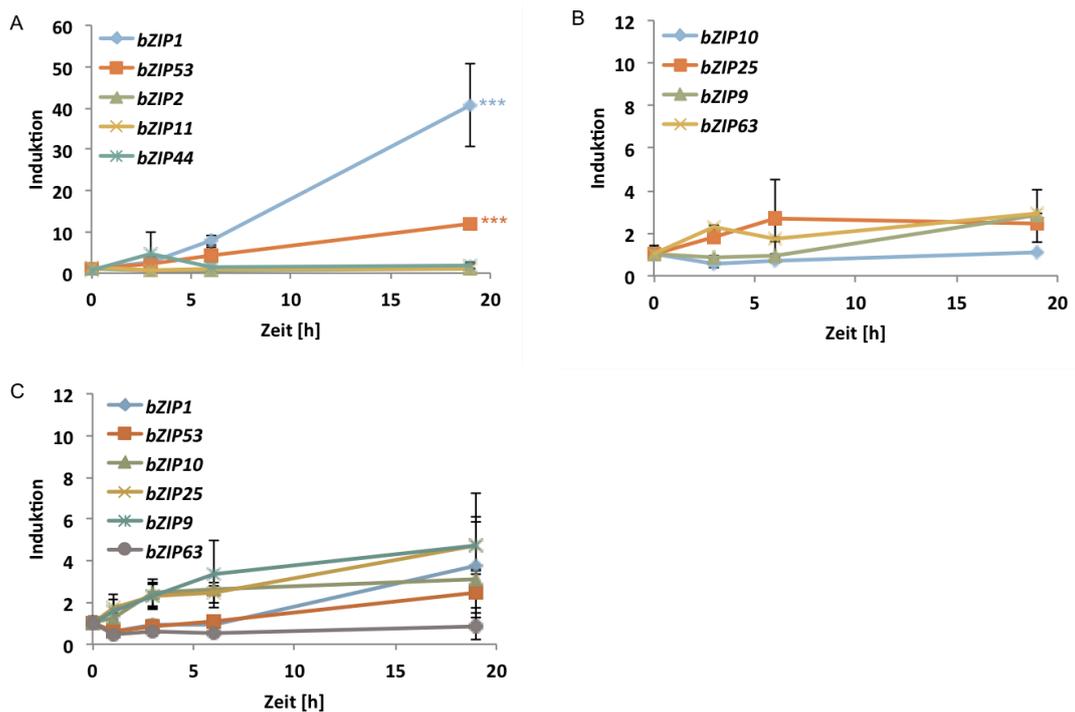
6.1 Die Induktion von *bZIP1* in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel wird durch unterschiedliche Stresse hervorgerufen

6.1.1 Die Expression der *bZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 *bZIP1* und *bZIP53* wird durch Salz induziert

Es ist bekannt, dass spezifische *bZIP*-Transkriptionsfaktoren des C/S1-Netzwerkes eine erhöhte Transkription nach abiotischem Stress aufweisen (Weltmeier et al., 2009). Um die Expressionsprofile der Transkriptionsfaktorgene der Gruppe C und S1 nach Salzstress zu zeigen, wurden *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen, die in Hydroponik angezogen wurden, unterschiedlich lang mit hypertoner Salzlösung (150 mM NaCl) behandelt und danach die Induktion der Transkriptionsfaktorgene des C/S1-Netzwerks mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) im getrennt voneinander geernteten Blatt- bzw. Wurzelmaterial analysiert.

In den Abbildungen 6.1 A-C ist dargestellt, dass die Expression von *bZIP1* sechs Stunden nach der Zugabe von NaCl in der Wurzel signifikant ansteigt. Auch *bZIP53* zeigt einen Expressionsanstieg, der jedoch gegenüber *bZIP1* deutlich geringer ist. Die Expression der weiteren Gene der Gruppe S1 (*bZIP2*, *bZIP11* und *bZIP44*) (Abbildung 6.1 A), sowie die der Gruppe C (*bZIP10*, *bZIP25*, *bZIP9* und *bZIP63*) (Abbildung 6.1 B) ändert sich durch Salzstress hingegen nicht.

Im Blatt zeigt sich keine deutliche Veränderung der Expression der *bZIP*-Transkriptionsfaktoren des C/S1-Netzwerkes unter diesen Stressbedingungen (Abbildung 6.1 C).



Abbildungung 6.1: **Expression von bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in Blatt und Wurzel nach Salzstress:** Wildtyppflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression der unterschiedlichen Transkriptionsfaktorgene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial der Gruppe S1 (A) bzw. der Gruppe C (B), sowie von Blattmaterial (C) nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *Ubiquitin5* (*UBQ5*). (n=2-3; Fehler: SD; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.1.2 *bZIP1* wird durch osmotischen Stress induziert

Um festzustellen, ob die Transkription von *bZIP1* spezifisch durch NaCl induziert wird, wurden in Hydroponik angezogene Pflanzen mit unterschiedlichen Salzen (KCl, MgCl₂, Na₂SO₄) und zur osmotischen Kontrolle mit Mannitol versetzt. Alle zugegebenen Lösungen haben die gleiche osmotische Stärke (0,25 mosm/l).

Die Abbildung 6.2 zeigt, dass nicht nur NaCl die Transkription von *bZIP1* induziert, sondern auch die anderen Salze. Sowohl ionische als auch osmotische Veränderungen tragen dazu bei, dass *bZIP1* stärker exprimiert wird. Den stärksten Effekt kann man hier bei Na₂SO₄ und MgCl₂ beobachten, NaCl und Mannitol zeigen eine gleich starke Wirkung auf die Transkription von *bZIP1*. Bei allen Stressen beginnt die verstärkte Expression von *bZIP1* aber nahezu zur selben Zeit.

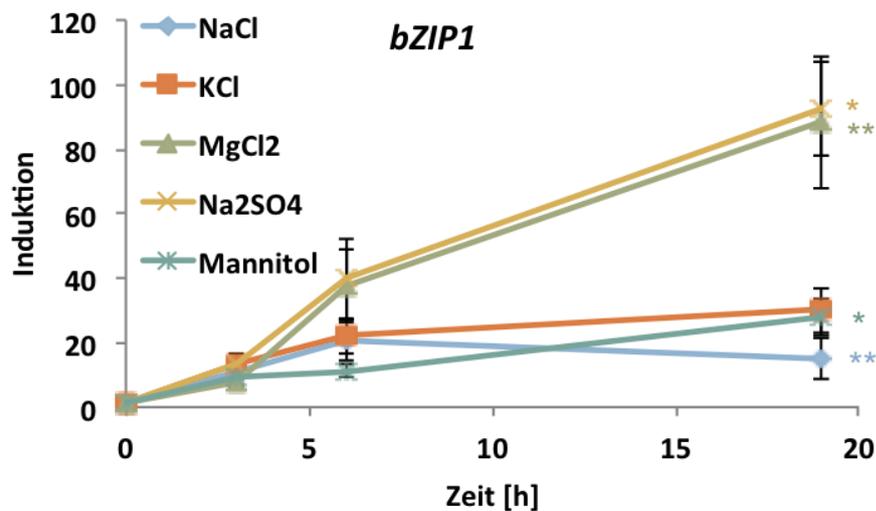


Abbildung 6.2: **Expression von *bZIP1* in der Wurzel nach ionischem und osmotischem Stress:** Wildtyppflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl, 150 mM KCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM Na₂SO₄ bzw. 360 mM Mannitol behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *bZIP1* untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=3; Fehler: SE; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.1.3 Die Expression von *bZIP1* wird durch ABA verstärkt, ist aber unabhängig vom klassischen ABA-Signaltransduktionsweg

Unter Stressbedingungen wie z.B. Trockenheit und zu hohe Salzkonzentrationen wird das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) gebildet. Die Expression einer großen Anzahl von Genen wird durch ABA unter Stressbedingungen reguliert (Leung and Giraudat, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Im Folgenden soll untersucht werden, ob ABA eine Rolle in der salzinduzierten Expression von *bZIP1* spielt.

6.1.3.1 Die Transkription von *bZIP1* und *bZIP53* wird durch ABA induziert

Um einen Einblick zu bekommen, ob die Applikation von ABA genauso wie Stress durch NaCl die Transkription von *bZIP1* induzieren kann, wurden zunächst wildtypische Hydroponikpflanzen (Col-0) zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10 μM ABA versetzt und die Expression von *bZIP1* und *bZIP53* mittels qRT-PCR ermittelt.

Es ist gezeigt, dass die Gabe von ABA einen positiven Effekt auf die Expression der Transkriptionsfaktorgene hat. Die Expression steigt im Laufe der Zeit an, jedoch nicht so stark wie nach NaCl. Wieder ist zu beobachten, dass die Induktion von *bZIP1*

deutlich stärker ist, als die von *bZIP53*. In der qRT-PCR wurde zusätzlich die Expression der *bZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C nach Gabe von ABA untersucht. Aus der Abbildung 6.3 geht hervor, dass nur eine sehr geringe bis gar keine Expression induziert wird.

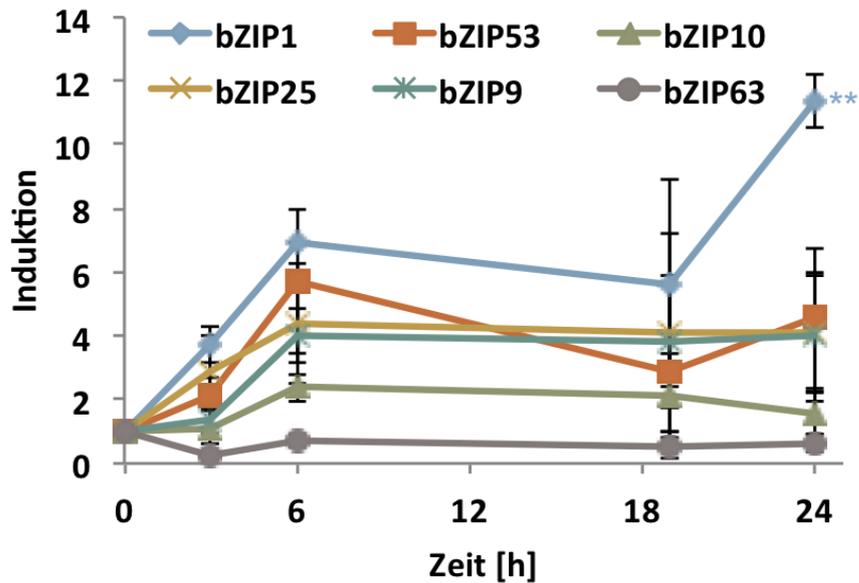


Abbildung 6.3: **Expression von *bZIP*-Transkriptionsfaktoren *bZIP1* und *bZIP53* sowie der Gruppen C in der Wurzel nach ABA-Gabe:** Wildtyppflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h, 24 h) mit 10 μ M ABA behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression verschiedener Transkriptionsfaktorgene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n= 3-4, p < 0,05, Fehler: SD; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.1.3.2 Die salzinduzierte *bZIP1*-Expression ist unabhängig von der ABA-Biosynthese und -Signaltransduktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression von *bZIP1* und *bZIP53* durch ABA verstärkt wird, soll nun im Umkehrschluss untersucht werden, ob diese Expression der beiden Transkriptionsfaktoren auch aus einer direkten Abhängigkeit von ABA hervorgerufen wird. Dafür wurden verschiedene Pflanzenlinien zu den Versuchen hinzugezogen, die in unterschiedlichen Genen, die in der ABA-Biosynthese, sowie ABA-Signaltransduktion eine Rolle spielen, mutiert sind. Es wurden die Linie *aba2*, die Dreifachmutante *snrk2.2/2.3/2.6* und die Dreifachmutante *areb1/areb2/abf3* analysiert. ABA2 katalysiert den Schritt von Xantoxin zu ABA-Aldehyd während der ABA-Biosynthese, die drei SnRK2-Kinasen spielen eine Rolle in der ABA-Signaltransduktion und codieren für die Snf-1 verwandten Proteinkinasen (SnRK2) und werden durch io-

nische und nicht-ionische Stimuli aktiviert (Fujii et al., 2009; Fujii and Zhu, 2009). Die *AREBs/ABFs* codieren für bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe A und sind dafür bekannt, dass sie nach Stress an Promotorelemente von ABA-responsiven Genen (ABRE) binden und deren Transkription initiieren (Yoshida et al., 2010)).

Für die Experimente wurden sowohl Wildtyppflanzen als auch die Mutanten in Hydroponik angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten mit 150 mM NaCl gestresst. In qRT-PCR-Versuchen wurde zunächst die Expression von *bZIP1* und *bZIP53*, sowie von bZIP-Transkriptionsfaktorgenen der Gruppe C in *aba2*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. In den Abbildungen 6.4 A und B wird veranschaulicht, dass sich die Expression von *bZIP1* und *bZIP53* (A) in den Wurzeln der *aba2*-Pflanzen nicht signifikant unterscheidet.

Weitere qRT-PCR-Analysen wurden durchgeführt, um die Expression der Gene der Gruppe C-bZIPs in der *aba2*-Mutante zu untersuchen (B). Genau wie *bZIP1* und *bZIP53* werden *bZIP9*, *bZIP10* und *bZIP25* nicht unterschiedlich zum Wildtyp in der *aba2*-Mutante reguliert. *bZIP63* hingegen zeigt einen starken Expressionsanstieg, sobald das *ABA2*-Gen mutiert ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Transkription von *bZIP63* durch ABA reprimiert wird.

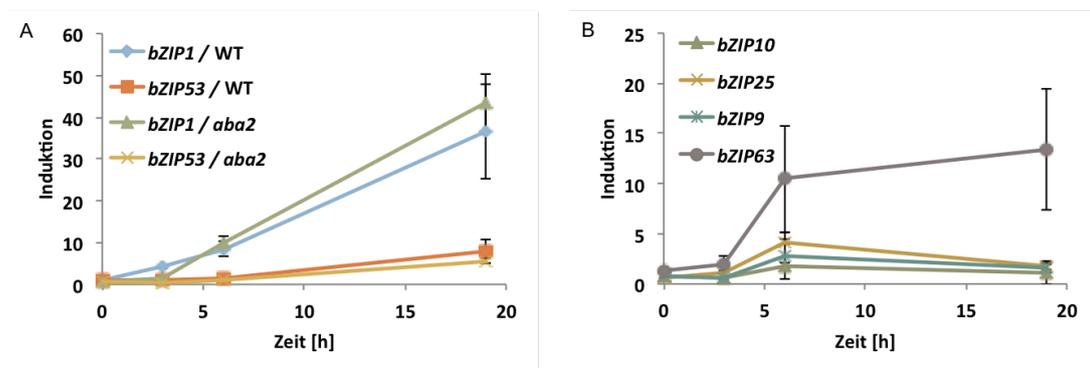


Abbildung 6.4: **Expression der bZIP-Transkriptionsfaktoren *bZIP1* und *bZIP53* sowie der Gruppe C in der Wurzel im Wildtyp und der *aba2*-Mutante nach Behandlung mit Salz:** Wildtyp- und *aba2*-Pflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression verschiedener Transkriptionsfaktorgene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5* von *bZIP1* und *bZIP53* (A), sowie der Gruppe C (B). (n=2-3; Fehler: SD; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Des Weiteren wurde nun die Expression von *bZIP1* und *bZIP53* in den anderen oben aufgeführten Linien untersucht.

bZIP1 zeigt in allen Linien eine etwa gleich starke Expression und ist somit unabhängig von den Komponenten der ABA-vermittelten Signaltransduktion. *bZIP53*

zeigt in der *snrk2.2/2.3/2.6*-Dreifachmutante eine Reduktion der Expression. In der *areb1/areb2/abf3*-Linie ist keine Induktion mehr zu beobachten. Man kann davon ausgehen, dass trotz ihrer starken Homologie *bZIP1* und *bZIP53* unterschiedlich reguliert werden.

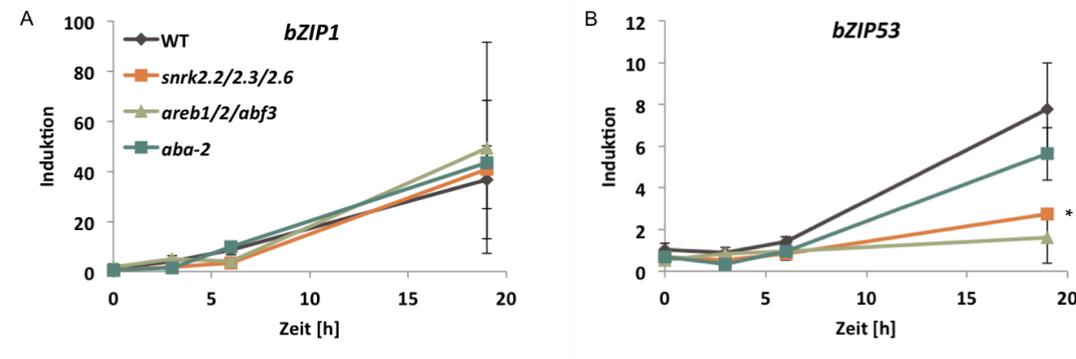


Abbildung 6.5: Expression von *bZIP1* und *bZIP53* in der Wurzel im Wildtyp, *snrk2.2/2.3/2.6* und *areb1/areb2/abf3* nach Behandlung mit Salz: Wildtyp-, *aba2*-, *snrk2.2/2.3/2.6*- und *areb1/areb2/abf3*-Pflanzen wurden sechs Wochen lang unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression verschiedener Transkriptionsfaktorgene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5* von *bZIP1* (A) und *bZIP53* (B). (n= 2-3; Fehler: SE; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.1.4 Die salzinduzierte Expression von *bZIP1* wird durch die Hexokinase HXK1 vermittelt

Nachdem gezeigt wurde, dass Einschränkungen in der ABA-Biosynthese, sowie -Signaltransduktion keinen Einfluss auf die salzinduzierte Expression von *bZIP1* haben, wurden weitere Signalwege untersucht, um die Funktion von *bZIP1* weiter zu erörtern.

Es ist bekannt, dass die Transkription von *bZIP1* durch Energieverarmung in Blättern aktiviert wird (Dietrich et al., 2011). Zudem ist bekannt, dass in dunkelinduzierten Keimlingen die Expression von *bZIP1* durch Gabe von Glukose inhibiert wird (Kang et al., 2010). Diese Inhibierung ist abhängig von der HEXOKINASE 1 (HXK1). HXK1 ist zum einen das Enzym, das den ersten Schritt der Glykolyse katalysiert, zum anderen ein Glukose-Sensor, durch den sowohl Genexpression als auch verschiedene Hormon-Signalwege reguliert werden (Sheen et al., 1999; Smeekens, 2000; Moore et al., 2003).

In der Abbildung 6.6 wird dargestellt, dass schon sehr geringe von außen gegebene Glukosemengen die *bZIP1*-Transkription verringern. Hier wurden drei Wochen alte Pflanzen, die auf MS-Agar-Platten gewachsen sind, mit unterschiedlichen Konzentrationen Glukose bzw. als osmotische Kontrolle mit Mannitol versetzt und die

Expression von *bZIP1* in der Wurzel mittels qRT-PCR überprüft.

Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass in der Wurzel schon geringe Mengen an Glukose (5,5 mM) ausreichen, um die Transkription von *bZIP1* zu verringern. Die Transkriptmenge von *bZIP1* nach Gabe von Mannitol hingegen bleibt konstant. Dadurch wird deutlich, dass die verringerte Expression von *bZIP1* durch Glukose und nicht durch einen osmotischen Stress hervorgerufen wird.

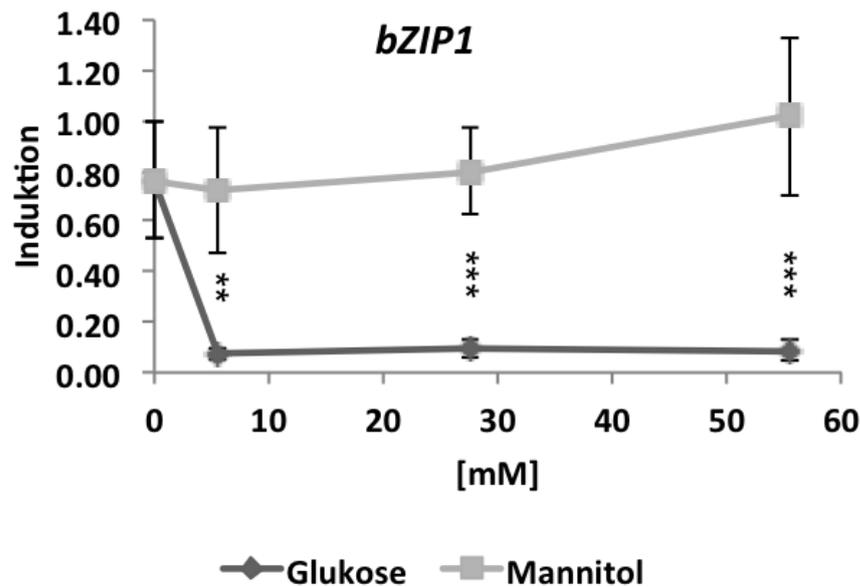


Abbildung 6.6: **Expression von *bZIP1* in der Wurzel nach Behandlung mit Glukose und Mannitol:** Wildtyppflanzen wurden drei Wochen lang auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden 6 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1, 0,5, 1 und 5 mM) von Glukose bzw. Mannitol behandelt und dann die Wurzeln davon geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *bZIP1* untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=2; Fehler: SE; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Für weitere Versuche bezüglich der Rolle von Glukose bzw. der Hexokinase HXK1 in der Regulierung der Expression von *bZIP1* wurde die *gin2*-Mutante (*glucose insensitive 2*) hinzugezogen, deren Perzeption von Glukose beeinträchtigt ist (Moore et al., 2003).

Dieser Versuch zeigt eine stark verringerte Induktion von *bZIP1* nach Salzstress in der *gin2*-Mutante (Abbildung 6.7).

Zudem konnte in einer Metabolomanalyse (siehe Anhang, Abbildungen 8.1 A-E) veranschaulicht werden, dass in salzgestressten Wildtyp-Wurzeln innerhalb der ersten sechs Stunden nach Salzstress die Glukose- und Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen stark ansteigen. Die *gin2*-Mutante hingegen zeigt bereits in der unbehandelten Wurzel eine hohe Glukose-Konzentration und eine Abnahme von Glukose-6-Phosphat nach

Salzstress. Auch die Mengen an Fruktose und Saccharose ändern sich in der *gin2*-Mutante. Daraus lässt sich schließen, dass die HXK1 Teil eines regulatorischen Netzwerks ist, dass über Kohlenhydratverfügbarkeit die salzinduzierte *bZIP1*-Expression reguliert.

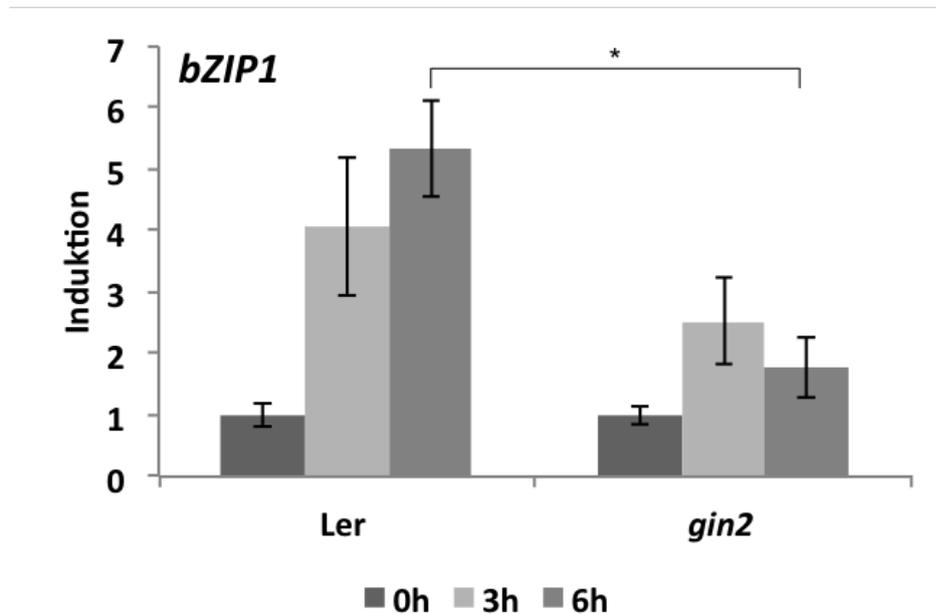


Abbildung 6.7: **Expression von *bZIP1* in der Wurzel von Wildtyp und *gin2* nach Behandlung mit NaCl:** Wildtyppflanzen (Ler) und die *gin2*-Mutante wurden drei Wochen lang auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden 6 h bzw. 3 h lang mit 250 mM NaCl behandelt und dann die Wurzeln davon geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *bZIP1* untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=2-3; Fehler: SE; Anova; P= 0,05)

6.1.5 Die salzinduzierte Expression von *bZIP1* ist von der SnRK1-Signaltransduktion abhängig

Wie in Abschnitt 6.1.4 erwähnt, hat Zucker Einfluss auf die Transkription von *bZIP1* in der Wurzel. Die SnRK1 Kinasen KIN10 und KIN11 kontrollieren die transkriptionelle Umprogrammierung nach verschiedenen Stressen, die zu Energieverarmung führen, wie z.B. Dunkelheit. SnRK1 und *bZIP1* weisen eine genetische Interaktion miteinander auf. Es wird vermutet, dass *bZIP1* von SnRK1 reguliert wird (Baena-Gonzalez et al., 2007). Da das vorherige Experiment zeigen konnte, dass das Wahrnehmen von Zucker in der Zelle über die HXK1 einen Einfluss auf die Transkription von *bZIP1* hat, wurden nun zwei Mutanten der SnRK1-Familie für weitere Experimente hinzugezogen.

In den nachfolgenden Versuchen wurde auf Grund von hoher funktioneller Redundanz von KIN10 und KIN11 (Baena-Gonzalez et al., 2007) eine β -Estradiol induzierbare

artificial micro RNA (ami) *kin11* in einem *kin10* Hintergrund (*kin10/ami-kin11*) verwendet (Pedrotti et al, unveröffentlicht).

Für diesen Versuch wurden zwei Wochen alte Pflanzen auf MS-Agar-Platten transferriert, die β -Estradiol enthielten und als Kontrolle auf Platten, die keines enthielten. Da sich in Vorversuchen von Lorenzo Pedrotti das Protein KIN11 als sehr stabil gezeigt hat, wurden die Pflanzen eine weitere Woche auf dem Estradiol enthaltenden Medium angezogen. Der Salzstress wurde für sechs bzw. drei Stunden appliziert und die Expression von *bZIP1* in der Wurzel mittels qRT-PCR überprüft. Im Wildtyp ist eine deutliche Induktion von *bZIP1* erkennen. Die Expression in der *kin10/ami-kin11* Linie hingegen ist deutlich reduziert.

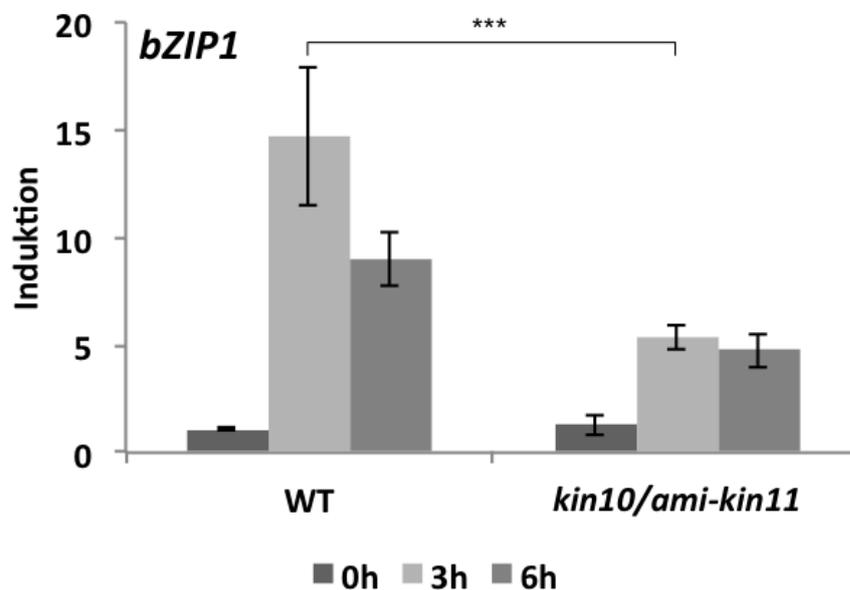


Abbildung 6.8: Expression von *bZIP1* in der Wurzel von Wildtyp und *kin10/ami-kin11* nach Behandlung mit NaCl: Wildtyppflanzen und die *kin10/ami-kin11* Linie wurden zwei Wochen auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden auf Platten transferriert, die 10 μ M β -Estradiol enthielten und zur Kontrolle auf Platten ohne Estradiol. Nach einer weiteren Woche wurden die Pflanzen 6 h bzw. 3 h mit 450 mM NaCl behandelt und dann die Wurzeln davon geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *bZIP1* untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von Wurzelmaterial, das nicht mit NaCl behandelt, aber auf β -Estradiol-enthaltende MS-Agar-Platten transferriert wurde, nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=4-6; Fehler: SD; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.1.6 Calcium ist an der salzinduzierten Expression von *bZIP1* beteiligt

In Wurzeln wird durch eine hohe Konzentration extrazellulärem NaCl das Einströmen von Ca^{2+} aus der Vakuole ausgelöst, um den Gehalt an freiem cytosolischem Ca^{2+} , das

als *second messenger* agiert, zu erhöhen (Lynch et al., 1989; Kiegle et al., 2000; Shi et al., 2000; Tracy et al., 2008). Als *second messenger* kann Ca^{2+} z.B. einen Komplex mit Calmodulin bilden, ein in Pflanzen ubiquitär vorkommendes Protein und so unter anderem verschiedene Proteine wie Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren etc. binden. Dadurch werden unter anderem viele verschiedene zelluläre Prozesse kontrolliert.

In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob die An- bzw. Abwesenheit von Ca^{2+} die Expression von *bZIP1* beeinflusst. Dafür wurden drei Wochen alte auf MS-Agar-Platten gewachsene Pflanzen mit verschiedenen Reagenzien behandelt. Zum einen mit Lanthanchlorid (LaCl_3), das als Calciumkanalblocker eingesetzt wird (Kaplan et al., 2006) und zum anderen mit N-(6-Aminohexyl)-5-chlor-1-naphtalinsulfonamid (W7). W7 ist eine organisch-chemische Verbindung, die sich vom Naphtalin ableitet und in der Zelle Ca^{2+} -Antworten auslöst (Kaplan et al., 2006). Es gehört zu den CaM Antagonisten und wurde in *Vicia faba* und *Beta vulgaris* beschrieben, die Ionenkanäle der Vakuole zu hemmen (Schulz-Lessdorf and Hedrich, 1995).

bZIP1 wird durch NaCl induziert (Abbildung 6.9), die schwächere Induktion im Gegensatz zu den im Vorfeld beschriebenen Experimenten ist damit zu erklären, dass in den folgenden Versuchen ein anderes Anzuchtssystem verwendet wurde. Die Pflanzen sind jünger, werden auf Agar-Platten anstatt in Hydroponik angezogen und werden daher auch mit anderen Konzentrationen an NaCl behandelt. Diese Methode erwies sich als praktikabler, sobald mehrere Substanzen verwendet wurden und auch als günstiger, da nicht so große Menge von teuren Substanzen wie W7 eingesetzt werden müssen.

Wenn zusätzlich zum NaCl noch LaCl_3 zu den Pflanzen gegeben wird, ist zu erkennen, dass die Expression von *bZIP1* deutlich reduziert ist. Die alleinige Gabe von W7 reicht aus, um *bZIP1* auch ohne NaCl zu induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein cytosolischer Calcium-Ausstrom eine Rolle in der salzinduzierten *bZIP1* Expression spielt und auch dafür notwendig ist.

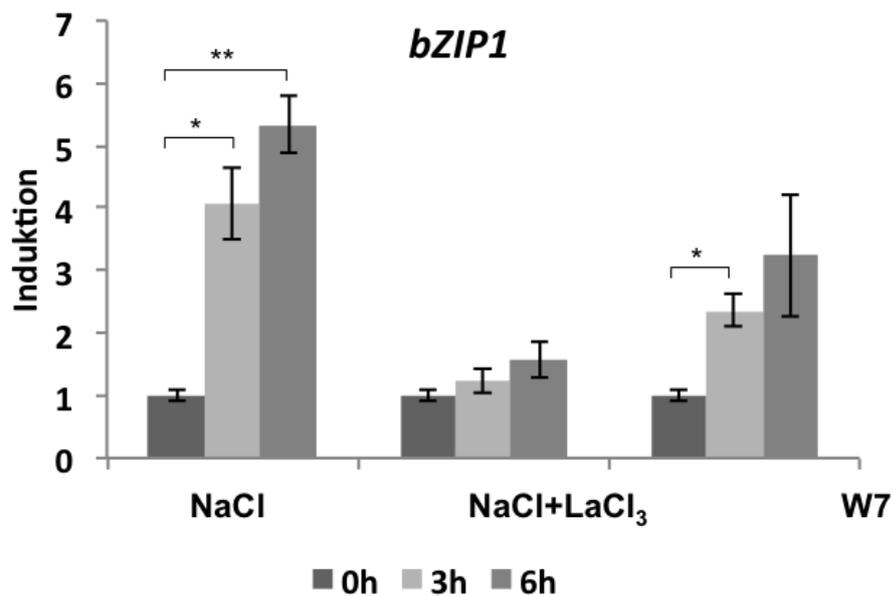


Abbildung 6.9: **Expression von *bZIP1* in der Wurzel nach Behandlung mit Salz, LaCl₃ und W7:** Wildtyppflanzen (Ler) wurden drei Wochen auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden dann 6 h bzw. 3 h lang mit 450 mM NaCl, 450 mM NaCl + 500 μ M LaCl₃ bzw. 100 μ M W7 behandelt und dann die Wurzeln davon geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die *bZIP1* Expression untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=3-4; Fehler: SE; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.1.6.1 Die Ca²⁺-vermittelte Signaltransduktion ist unabhängig von HXK1

Die in den vorherigen Experimenten verwendeten Linien *gin2* und *kin10/ami-kin11* wurden in diesen Versuch eingeschlossen, um herauszufinden, ob der salzinduzierte Calciumausstrom zeitlich vor oder nach der Regulation von HXK1 und SnRK1 geschieht.

in der Abbildung 6.10 A ist deutlich dargestellt, dass die Expression von *bZIP1* in der *gin2*-Mutante und im dazugehörigen Wildtyp nach der Behandlung mit LaCl₃ bzw. W7 sehr ähnlich ist. Dadurch lässt sich ableiten, dass die Hexokinase HXK1 nicht von der Ca²⁺-vermittelten Signaltransduktion abhängig sind. Für die *kin10/ami-kin11*-Mutante lässt sich nur eine Aussage bezüglich LaCl₃ treffen. Hier verhält sich die Mutante wieder, wie der Wildtyp. Um eine Abhängigkeit auszuschließen, müsste das Experiment mit W7 durchgeführt werden.

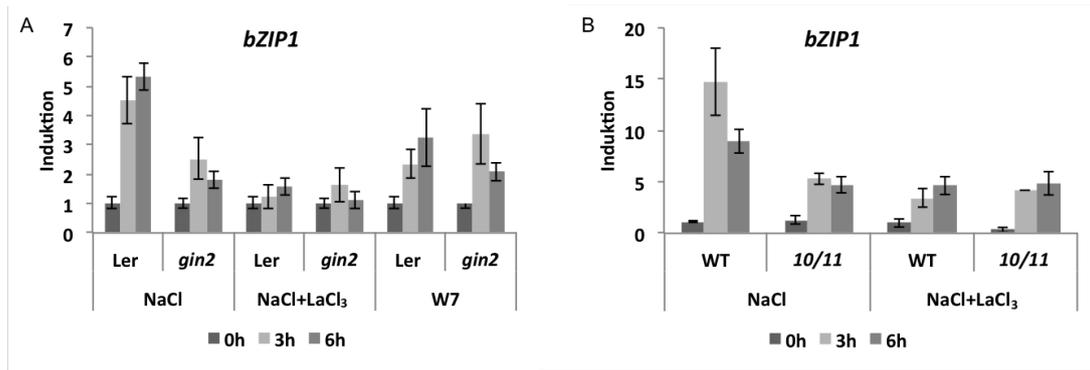


Abbildung 6.10: Expression von *bZIP1* in der Wurzel in Wildtyp (Col-0, Ler), *gin2* und *kin10/ami-kin11* nach Behandlung mit Salz, LaCl_3 und W7: Wildtyppflanzen (Ler, Col-0) und die Linien *gin2* und *kin10/ami-kin11* (10/11) wurden drei Wochen auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden dann 6 h bzw. 3 h lang mit 250 mM NaCl, 250 mM NaCl + 500 μM LaCl_3 (Ler, *gin2*) bzw. 100 μM W7, oder 450 mM NaCl, 450 mM NaCl + 500 μM LaCl_3 (Col-0, *kin10/ami-kin11*) behandelt und dann die Wurzeln davon geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die *bZIP1* Expression untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial von Ler und *gin2* (A) bzw. von Col-0 und *kin10/ami-kin11* (B) nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=4-6; Fehler: SE)

6.1.7 Die Signaltransduktionswege zur Aktivierung von *bZIP1* über HXK1 bzw. SnRK1 sind unabhängig von ABA

In den Experimenten in Kapitel 6.1.3.2 konnte bereits veranschaulicht werden, dass die ABA-vermittelte Signaltransduktion über SnRK2 und AREBs keinen Einfluss auf die salzinduzierte *bZIP1*-Induktion hat. Trotzdem konnte auch gezeigt werden, dass die Transkription von *bZIP1* durch die Gabe von ABA verstärkt wird.

Für den folgenden Versuch wurden nun die Linien *gin2* und *kin10/ami-kin11* auch mit ABA versetzt, um einen möglichen Einfluss von ABA auf die beiden Signaltransduktionswege zu überprüfen. Wie schon in den Versuchen mit LaCl_3 und W7 lassen sich nach Behandlung mit ABA keine deutlichen Unterschiede zwischen der Mutante und dem dazugehörigen Wildtyp erkennen (6.11). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Signalwege unabhängig voneinander agieren.

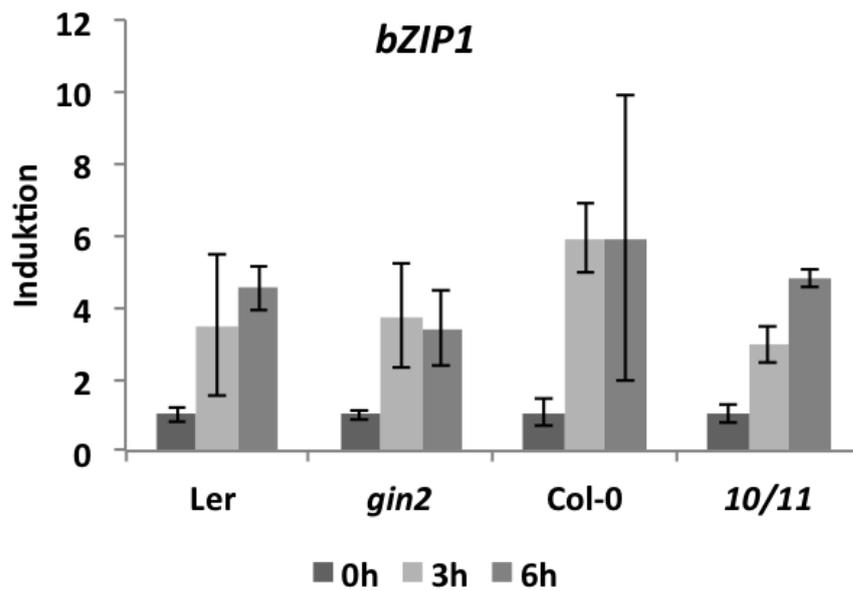


Abbildung 6.11: Expression von *bZIP1* in der Wurzel in Wildtyp (Col-0, Ler), *gin2* und *kin10/ami-kin11* nach Behandlung mit ABA: Wildtyppflanzen (Ler, Col-0) und die Linien *gin2* und *kin10/ami-kin11* (*10/11*) wurden drei Wochen auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden dann 6 h bzw. 3 h lang mit 10 μ M ABA behandelt und dann die Wurzeln davon geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *bZIP1* untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=4; Fehler: SE)

6.2 *bzip1*-Keimlinge zeigen keinen Phänotyp nach Salzstress

Nach Jakoby et al. (2002) werden bZIP-Transkriptionsfaktoren auf Grund von ähnlichen und konservierten Regionen in zehn Gruppen eingeteilt. Es wird vermutet, dass auch eine funktionelle Redundanz besteht (Jakoby et al., 2002). Da bekannt ist, dass die Transkriptionsfaktoren bZIP1 und bZIP53 vorzugsweise Heterodimere mit der Gruppe C bilden (Weltmeier et al., 2009), wurden für den folgenden Versuch verschiedene Einfach- und Mehrfachmutanten der bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 verwendet. Hier wurde die Keimungsrate der verschiedenen T-DNA-Insertionsmutanten betrachtet, nachdem die Samen auf 175 mM NaCl enthaltendem Medium ausgesät wurden.

Aus der Abbildung 6.12 geht hervor, dass die Einzelmutanten sich nicht sehr deutlich in ihrer Keimungsrate vom Wildtyp unterscheiden. Auch die T-DNA-Insertionsline *bzip10/bzip25* ist dem Wildtyp sehr ähnlich. Signifikant reduziert ist hingegen die Keimungsrate zum einen von der Doppelmutante *bzip1/bzip53* und zum anderen von der Quadrupelmutante *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* gegenüber dem Wildtyp.

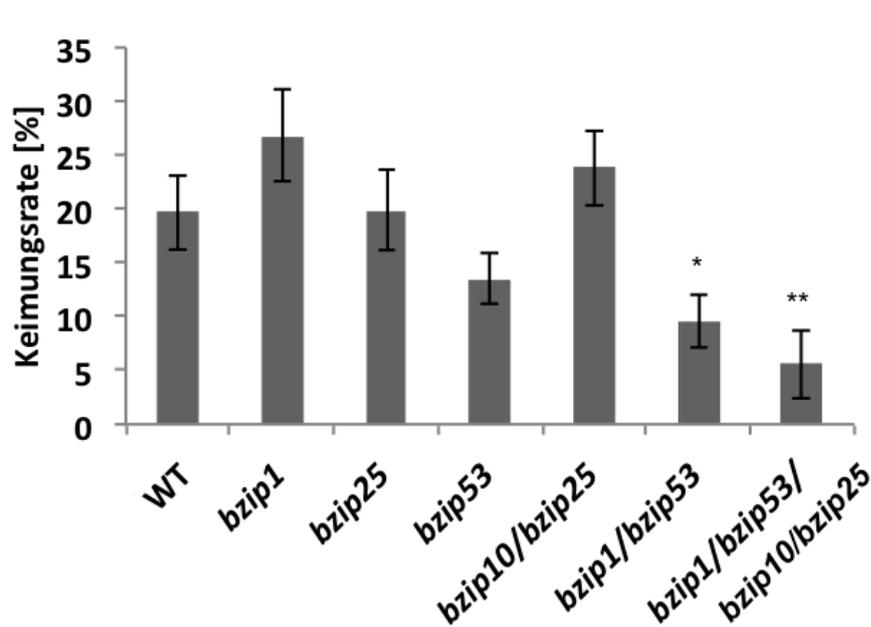


Abbildung 6.12: **Keimungsrate von verschiedenen Einfach- und Mehrfachmutanten des bZIP-C/S1-Netzwerks unter Salzstress:** *Arabidopsis thaliana*-Samen wurden auf MS-Medium mit einer NaCl Konzentration von 175 mM ausgelegt. Nach zwölf Tagen wurden die Keimlinge mit zwei grünen Blättern ausgezählt. Dargestellt ist die Prozentzahl der ausgekeimten Samen im Vergleich zu den ausgelegten. (n=170-350; Fehler: SD; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Da die *bzip1*-Einzelmutante keinen eindeutigen Phänotyp zeigt und man von funktio-

neller Redundanz ausgeht, wurden die nachfolgenden Experimente in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante bzw. in der *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25*-Quadrupelmutante durchgeführt.

Es wurden auch Experimente zur Wurzellänge nach Salzstress in den beiden Mutanten durchgeführt, dort konnte jedoch kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden (s. Anhang, Abbildung 8.2).

6.3 In der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel spielen bZIP1 und bZIP53 eine Rolle in der metabolischen und transkriptionellen Anpassung an Salzstress

Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils soll nun erläutert werden, ob bZIP1 Funktionen in der metabolischen und transkriptionellen Anpassung nach Salzstress in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel einnimmt.

6.3.1 Der Wildtyp zeigt in der Wurzel schnelle und starke transkriptionelle Veränderungen nach Salzstress

Um die Auswirkungen von Salzstress auf das Transkriptom und auf das Metabolom von *Arabidopsis thaliana*-Wurzeln näher zu untersuchen, wurden im Zuge meiner Diplomarbeit (Hartmann, 2009) sowohl eine Microarrayanalyse (in Kooperation mit Johannes Hanson, Universität Utrecht), als auch eine Metabolomanalyse (in Kooperation mit Stefan Kempa, MPI Golm, Potsdam, bzw. Agnes Fekete mit Jasper Schierstaedt und Markus Krischke, Pharmazeutische Biologie Universität Würzburg) durchgeführt.

Die Pflanzen für diese Untersuchungen wurden sechs Wochen in Hydroponik angezogen und über unterschiedlich lange Zeiträume mit Salz behandelt. Die Zeitpunkte für die Transkriptomanalyse waren 1 h, 3 h, und 6 h. Für die Metabolomanalyse wurden zusätzlich noch die Zeitpunkte 24 h und 48 h genommen. Alle Wurzel-Proben wurden zum gleichen Zeitpunkt (0 h) geerntet.

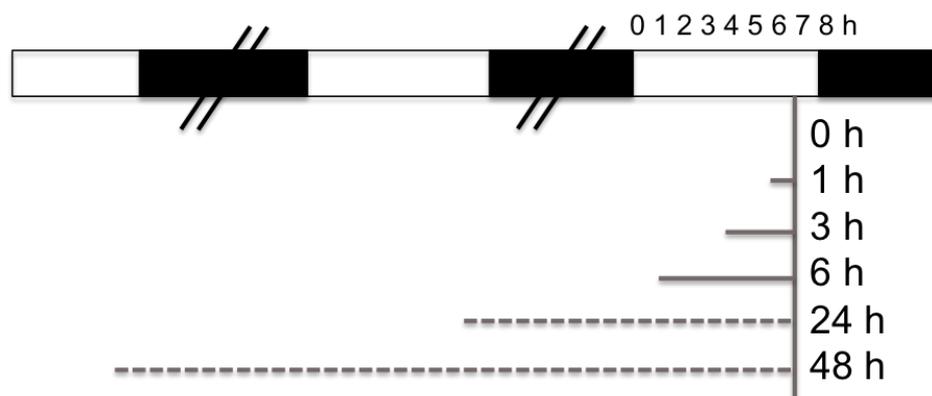


Abbildung 6.13: **Ernteschema für Transkriptom- und Metabolomanalyse:** Unter Kurztagbedingungen (8 h Licht (weiße Balken), 16 h Dunkelheit (schwarze Balken)) wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen in Hydroponik angezogen. Die Pflanzen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 150 mM NaCl gestresst. Transkriptom: 1 h, 3 h, 6 h (graue durchgezogene Balken), Metabolom: zusätzlich 24 h und 48 h (graue gestrichelte Balken). Zum Zeitpunkt 0 h wurden die Wurzeln der Pflanzen gleichzeitig geerntet.

Für einen groben Überblick über die transkriptionellen Veränderungen im Wildtyp, wurde zunächst ein Venn-Diagramm erstellt, auf dem zu sehen ist, wie viele Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten signifikant unterschiedlich zum unbehandelten Wurzelmaterial reguliert werden. Das Diagramm (Abbildung 6.14) zeigt, dass bereits eine Stunde nach NaCl-Zugabe rund 850 Gene signifikant verstärkt exprimiert werden. Die meisten dieser Gene (687) werden auch zu den Zeitpunkten 3h und 6 h weiterhin verstärkt exprimiert. Im Laufe der Zeit wird die transkriptionelle Umprogrammierung immer deutlicher, nach 3 h Salzstress werden ca. 1400 Gene, nach 6 h 2000 Gene stärker als in der unbehandelten Wurzel exprimiert.

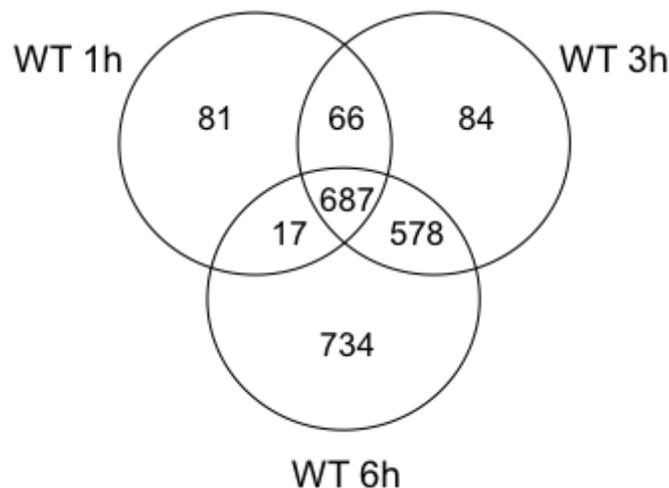


Abbildung 6.14: **Venn-Diagramm der hochregulierten Gene der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel nach Salzstress:** Abgebildet sind die Daten aus der Microarray-Analyse. Die Zahlen stehen für die hochregulierten Gene in der Wildtyp-Wurzel nach 1h, 3h und 6h Salzstress im Vergleich zur unbehandelten Wurzel. Gezeigt sind die Gene mit einem Induktionswert von $\log_2 > 0,7$, sowie mit einem p-Wert von $< 0,01$.

6.3.1.1 Die transkriptionelle Umprogrammierung in der Wildtyp-Wurzel geschieht bereits in den ersten 60 Minuten

In den hier gezeigten Ergebnissen einer *Gene Ontology*-Auswertung (GO) (Abbildung 6.15) wurden die Gene, die zu den verschiedenen Zeitpunkten differentiell reguliert werden, in funktionelle Gruppen sortiert. Nach einer Stunde Salzstress ist zu beobachten, dass der Großteil der induzierten Gene eine bekannte Funktion in der Antwort auf sowohl biotischen als auch abiotischen Stress hat. Die Tabelle 6.1 listet die 40 am

stärksten induzierten Gene auf. Besonders auffällig ist, dass sehr viele Gene gezeigt werden, die für Transkriptionsfaktoren kodieren bzw. die mit Transkription assoziiert sind. Besonders stark exprimiert sind z.B. der Heat-Shock-Faktor *HSFA6B* (*HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A6B*) und die ERFs *ERF13* (*ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 13*) und *ORA47* (*ERF18*). Schon allein unter den 40 am stärksten regulierten Genen sind 15 Transkriptionsfaktorgene zu finden. Die vollständige Tabelle (mit Induktionswerten $> \log_2(3)$) befindet sich im Anhang, Tabelle 8.1.

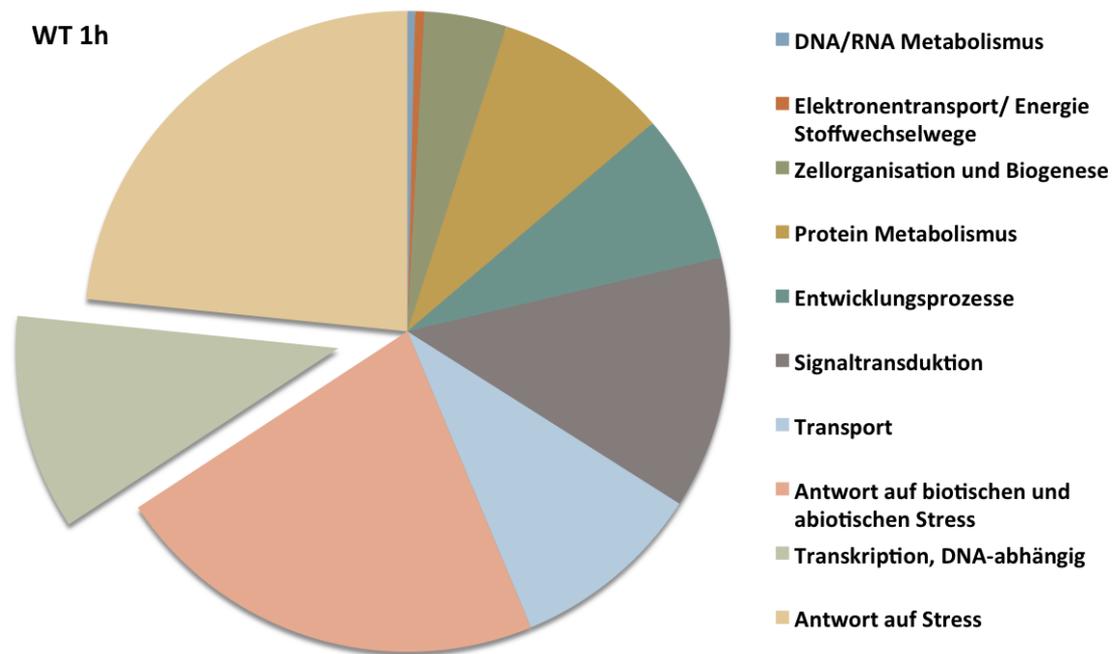


Abbildung 6.15: **GO-Annotation, der im Wildtyp nach einer Stunde Salzstress hochregulierten Gene:** Das Diagramm zeigt die GO-Annotation (TAIR) von Genen, die in der Microarrayanalyse nach einer Stunde Salzstress einen Induktionswert von $> \log_2(0,7)$, sowie einen p-Wert von $< 0,01$ hatten. Zur besseren Übersicht wurden die Gene mit unbekannter Funktion nicht in dem Diagramm aufgeführt.

Tabelle 6.1: **Ausschnitt der in Wildtyp nach 1h Salzstress hochregulierten Gene:** Die Tabelle zeigt die 40 Gene, die in der Microarrayanalyse nach 1h Salzstress am stärksten induziert waren. Hervorgehoben sind die Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren (grau).

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	p-Wert
AT3G22830	<i>AT-HSFA6B</i> (<i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A6B</i>)	5.82	6E-14

AT1G56600	<i>AtGOLS2</i> (<i>GALACTINOL SYNTHASE 2</i>)	4.87	3E-16
AT5G20230	<i>ATBCB</i> (<i>ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN</i>)	4.80	4E-06
AT2G44840	<i>ERF13</i> (<i>ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 13</i>)	4.56	3E-04
AT4G34410	<i>RRTF1</i> (<i>REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1</i>)	4.49	2E-03
AT4G37710	VQ motif-containing protein	4.43	1E-07
AT5G13220	<i>JAZ10</i> (<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10</i>)	4.37	1E-06
AT1G74930	<i>ORA47</i> ; DNA binding / transcription factor	4.37	4E-04
AT4G28140	AP2 domain-containing transcription factor, putative	4.06	1E-14
AT2G26150	<i>ATHSFA2</i> (<i>HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A2</i>)	4.06	4E-09
AT5G42380	<i>CML37</i> (<i>CALMODULIN LIKE 37</i>)	4.00	1E-03
AT3G50930	<i>BCS1</i> (<i>CYTOCHROME BC1 SYNTHESIS</i>)	3.98	2E-04
AT4G25490	<i>CBF1</i> (<i>C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 1</i>)	3.97	3E-05
AT1G32970	subtilase family protein	3.88	9E-06
AT1G01720	<i>ANAC002</i> (<i>ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2</i>)	3.72	1E-07
AT5G51990	<i>CBF4</i> (<i>C-REPEAT-BINDING FACTOR 4</i>)	3.71	1E-08
AT5G52760	heavy-metal-associated domain-containing protein	3.68	8E-05
AT3G01830	calmodulin-related protein, putative	3.65	4E-03
AT1G17380	<i>JAZ5</i> (<i>JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 5</i>)	3.59	2E-04
AT1G19210	AP2 domain-containing transcription factor, putative	3.59	6E-03
AT5G64870	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	3.58	7E-04
AT1G12610	<i>DDF1</i> (<i>DWARF AND DELAYED FLOWERING 1</i>)	3.58	3E-03
AT1G64160	disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein	3.57	6E-06
AT5G05410	<i>DREB2A</i> (<i>DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2</i>)	3.57	9E-07
AT3G28600	ATP binding / ATPase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	3.55	6E-08
AT1G80840	<i>WRKY40</i> (<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 40</i>)	3.53	3E-03
AT3G44860	<i>FAMT</i> (<i>FARNESOIC ACID CARBOXYL-O-METHYLTRANSFERASE</i>);	3.52	2E-05
AT2G29450	<i>ATGSTU5</i> (<i>ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 5</i>)	3.52	3E-07
AT3G02840	immediate-early fungal elicitor family protein	3.52	5E-03
AT1G61340	F-box family protein	3.48	2E-04
AT2G26380	disease resistance protein-related / LRR protein-related	3.45	1E-06
AT3G23250	<i>MYB15</i> (<i>MYB DOMAIN PROTEIN 15</i>)	3.44	2E-03
AT5G63130	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	3.43	3E-07

AT1G76640	calmodulin-related protein, putative	3.41	2E-04
AT5G22530	unknown protein	3.40	9E-06
AT5G19110	extracellular dermal glycoprotein-related / EDGP-related	3.38	6E-07
AT3G25760	<i>AOC1</i> (<i>ALLENE OXIDE CYCLASE 1</i>)	3.37	3E-05
AT4G27657	unknown protein	3.36	3E-04
AT4G31800	<i>WRKY18</i> (<i>WRKY DNA-BINDING PROTEIN 18</i>)	3.34	1E-05
AT1G09950	transcription factor-related	3.34	2E-04

Nach drei bzw. sechs Stunden Salzstress werden weiterhin viele Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, stark induziert. Allerdings sind es verhältnismäßig deutlich weniger. Induziert sind nun viele Gene, die in der ABA-Antwort bzw. -Signaltransduktion eine Rolle spielen (Tabelle 6.2), wie z.B. *NCED2*, *NCED3* (*NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 2* und *3*) (Lefebvre et al., 2006; Iuchi et al., 2001), *PP2C* (*PROTEIN PHOSPHATASE 2CA*) (Schweighofer et al., 2004) oder *HAI1*, *2* und *3* (*HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1, 2* und *3*) (Fujita et al., 2009). Außerdem sind viele *LEA*-Gene (*LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT*), die in der Samenentwicklung sehr wichtig sind (Alonso et al., 2009), zu finden, sowie eine Reihe an Calmodulin-Genen. Calmoduline binden Ca^{2+} und spielen somit in *second messenger*-Systemen eine bedeutende Rolle (Lee et al., 2000; Yang and Poovaiah, 2003).

Tabelle 6.2: **LEA- und ABA assoziierte Gene, die nach 3h NaCl im Wildtyp verstärkt induziert sind:** Die Tabelle zeigt die mit LEA- und ABA assoziierten Gene, die in der Microarray Analyse nach 3 h Salzstress im Wildtyp verstärkt exprimiert werden.

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	p-Wert
AT1G07430	<i>HAI2</i> (<i>HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 2</i>)	5.16	2E-14
AT3G15670	<i>LEA76</i> (<i>LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 76</i>)	5.06	6E-13
AT5G06760	<i>LEA4-5</i> (<i>LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 5-5</i>)	4.50	7E-10
AT3G14440	<i>NCED3</i> (<i>NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 2</i>)	4.37	7E-11
AT5G59220	<i>HAI1</i> (<i>HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1</i>)	4.17	1E-11
AT2G29380	<i>HAI3</i> (<i>HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 3</i>)	3.58	2E-12
AT1G52690	<i>LEA7</i> (<i>LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 7</i>)	3.38	5E-07
AT1G01470	<i>LEA14</i> (<i>LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4</i>)	2.14	3E-08
AT3G11410	<i>PP2CA</i> (<i>PROTEIN PHOSPHATASE 2CA</i>)	1.99	2E-11
AT4G18350	<i>NCED2</i> (<i>NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3</i>)	1.37	2E-03
AT2G40180	<i>PP2C5</i> (<i>PROTEIN PHOSPHATASE 2C5</i>)	1.32	4E-05
AT2G35300	<i>LEA18</i> (<i>LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 18</i>)	1.13	4E-03
AT3G05640	<i>PP2C</i> , (<i>PROTEIN PHOSPHATASE 2C</i> putative)	1.04	8E-08

Auch einige Gene, die im Primärmetabolismus (Zucker- und Aminosäurestoffwechsel) eine Rolle spielen, werden verstärkt nach drei und sechs Stunden Salzstress induziert. Verstärkt induzierten werden z.B. *TAT3* (*TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3*), *BCAT2* (*BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2*) (Diebold et al., 2002) und *ALAAT1* (*ALANINE AMINOTRANSFERASE 1*) (Liepman and Olsen, 2003). Diese Gene sind alle am Aminosäureabbau beteiligt. Gene des Zuckermetabolismus, die nach 3 h bzw. 6 h Salzstress verstärkt induziert werden, sind unter anderem *SUS1*, *SUS3*, *SUS4* (*SUCROSE SYNTHASE 1, 3 und 4*) (Baud et al., 2004), *SPS2F* (*SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE 2F*) (Lutfiyya et al., 2007), *SUC2* (*SUCROSE TRANSPORTER 2*) (Sauer and Stolz, 1994), *SPP2* (*SUCROSE PHOSPHATASE 2*) (Lunn et al., 2000). Die vollständigen Tabellen (Induktion $> \log_2(3)$) befinden sich im Anhang.

Salzstress führt demzufolge in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* zu einer starken transkriptionellen Umprogrammierung, indem zunächst viele Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und später dadurch eine massive Veränderung im Zucker- und Aminosäuremetabolismus ausgelöst wird.

6.3.2 Die *bzip1/bzip53*-T-DNA-Insertionslinie zeigt eine differentielle Genexpressionen nach Salzstress im Vergleich zum Wildtyp

Die in der Microarray-Analyse für den Wildtyp erhobenen Genexpressionsdaten wurden mit denen der *bzip1/bzip53*-T-DNA-Insertionslinie verglichen. Auch hier wird zunächst in einem Venn-Diagramm gezeigt (Abbildung 6.16), das die Anzahl der Gene abbildet, die in der *bzip1/bzip53*-Mutante nach einer, drei oder sechs Stunden Salzstress im Gegensatz zum Wildtyp zum gleichen Zeitpunkt herunterreguliert wurden.

Hier ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass es keine großen Unterschiede zwischen den Genen, die im Wildtyp und denen in der *bzip1/bzip53*-Mutante herunterreguliert sind, gibt. Fast kein Gen wird zu jedem der drei Zeitpunkte differentiell zum Wildtyp reguliert. Die einzigen Gene, die zu jedem Zeitpunkt herunterreguliert werden, sind *bZIP1* und *bZIP53*.

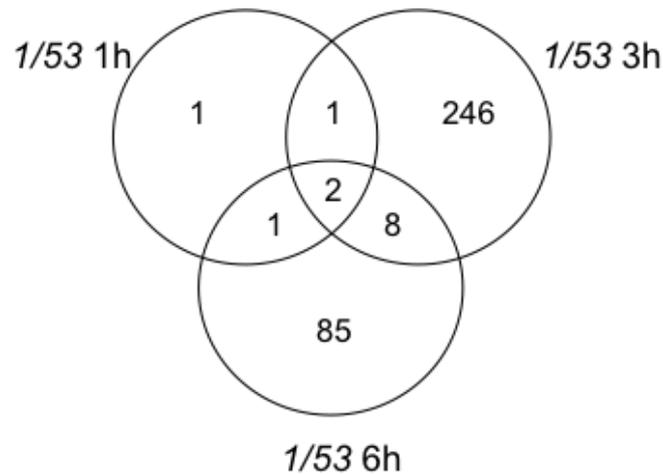


Abbildung 6.16: **Venn-Diagramm der herunterregulierten Gene in der Wurzel der *bzip1/bzip53*-T-DNA-Insertionslinie nach Salzstress im Vergleich zum Wildtyp:** Abgebildet sind die Daten aus der Microarray-Analyse. Die Zahlen stehen für die herunterregulierten Gene in der Wurzel der *bzip1/bzip53*-Mutante nach 1 h, 3 h und 6 h Salzstress im Vergleich zur Wildtyp-Wurzel, die gleich lang mit Salz behandelt wurde. Gezeigt sind die Gene mit einem Induktionswert $> \log_2(0,7)$ sowie mit einem p-Wert $< 0,01$.

Die Anzahl der in der Doppelmutante differentiell regulierten Gene nach drei bzw. sechs Stunden Salzstress ist höher als nach einer Stunde. In den folgenden Tabellen werden die am stärksten unterschiedlich regulierten Gene im Vergleich zum Wildtyp aufgelistet. Die vollständigen Tabellen (bis $> \log_2(0,7)$) befinden sich im Anhang (Tabellen 8.4 und 8.5). Sie zeigen, dass es Unterschiede in der Regulation der Gene gibt. Die Differenz der Induktionswerte in der *bzip1/bzip53*-Mutante ist aber im Vergleich zum Wildtyp nicht besonders stark.

Auffallend ist, dass zum Zeitpunkt 3 h viele Gene, die mit Hypoxia assoziiert sind, in der *bzip1/bzip53*-Mutante herunterreguliert sind (Tabelle 6.3). Zu Hypoxia kommt es in der Pflanze durch Limitierung des Sauerstoffs durch die Photosyntheseleistung, Diffusion aus dem Wasser oder durch den Verbrauch von Sauerstoff durch Stoffwechselaktivität. Hoher Sauerstoffmangel gefährdet die Zellatmung (Gupta et al., 2009; Zabalza et al., 2009) und führt zu ATP-Mangel in energieverbrauchenden Prozessen (Bailey-Serres and Voesenek, 2008; Geigenberger, 2003; van Dongen et al., 2003, 2004).

Nach drei Stunden Salzstress finden sich in der Microarrayanalyse z.B. *NIP2.1* (*NOD 26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 2;1*). Es gehört zu der Klasse der *NOD26-like intrinsic proteins* (NIPs), die eine Unterklasse der *major intrinsic proteins* (MIPs) bilden. MIPs sind Membrankanäle, die Wasser, ungeladene gelöste Substanzen, Gase und Spurenelemente leiten (Johanson et al., 2001; Tyerman et al., 2002). *NIP2.1* wurde bereits von Liu et al. (2005) beschrieben, dass es nach Hypoxia stark induziert wird.

SUS4 (*SUCROSE SYNTHASE 4*), *PDC1* (*PYRUVATE DECARBOXYLASE 1*) und *ADH1* (*ALCOHOL DEHYDROGENASE 1*) sind als sogenannte *core hypoxic ge-*

nes beschrieben, die mit dem anaeroben Stoffwechsel assoziiert sind (Gibbs et al., 2011).

HUP43 gehört zu den *HYPOXIA-RESPONSIVE UNKNOWN PROTEINS*, die als Überexprimierer eine erhöhte Toleranz gegenüber Sauerstoffstress zeigen (Mustroph et al., 2010). Zu diesen Genen werden auch solche gefunden, die bekannt sind, auf Hypoxia zu reagieren, deren Funktion aber weiterhin unbekannt ist (AT5G10040 und AT5G15120).

Tabelle 6.3: Hypoxia-Gene die nach 3 h NaCl in der *bzip1/bzip53*-Mutante herunterreguliert sind: Die Tabelle zeigt die mit Hypoxia assoziierten Gene, die in der Microarray Analyse nach 3 h Salzstress differentiell im Vergleich zum Wildtyp zum selben Zeitpunkt herunterreguliert wurden ($> \log_2(0,7)$, P-Wert: 0,01).

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	p-Wert
AT2G34390	<i>NIP2;1 (NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 2;1)</i>	-2.64	5E-04
AT3G43190	<i>SUS4 (SUCROSE SYNTHASE 4)</i>	-1.73	4E-05
AT1G43800	<i>SAD6 (STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN D9-DESATURASE 6)</i>	-1.64	5E-05
AT5G39890	<i>HUP43</i>	-1.59	4E-04
AT5G10040	unknown protein	-1.55	6E-03
AT5G15120	unknown protein	-1.28	2E-04
AT3G02550	<i>LBD41 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41)</i>	-1.28	2E-03
AT2G16060	<i>AHB1 (CLASS I HEMOGLOBIN)</i>	-1.18	2E-05
AT4G33070	<i>PDC1 (PYRUVATE DECARBOXYLASE 1)</i>	-1.12	3E-03
AT5G50590	<i>HSD4 (HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE 4)</i>	-0.99	5E-07
AT1G77120	<i>ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)</i>	-0.92	2E-03

Wie schon im Venn-Diagramm (Abbildung 6.16) gezeigt, gibt es kaum identische Gene, die sowohl nach drei als auch nach sechs Stunden in der *bzip1/bzip53*-Mutante nach Salzstress im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert werden.

Nach sechs Stunden Salzstress werden in der *bzip1/bzip53*-Mutante besonders Gene herunterreguliert, die im Aminosäureabbau eine Rolle spielen. Diese werden in der Tabelle 6.4 noch einmal zusammengefasst.

Die *GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1 (ASN1)* katalysiert den letzten Schritt in der Asparagin-Biosynthese von Aspartat zu Asparagin (Lam et al., 1994). Tyrosin wird zu Fumarat abgebaut. In diesem Abbauprozess spielen unter anderem die *TYROSIN AMINOTRANSFERASE 7 (TAT7)* und die *HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE (HGO)* eine Rolle (Riewe et al., 2012; Fernández-Cañón and Peñalva, 1995).

Im Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren ist unter anderem die *METHIONIN-GAMMA-LYASE (MGL)* von Bedeutung, die die Degradation von Methionin kataly-

siert (Goyer et al., 2007). Außerdem findet man in der Microarray-Analyse noch die Gene *BCAT2*, *BCDH* (*BRANCHED-CHAIN ALPHA-KETO ACID DEHYDROGENASE 2*), *BCE2* (*DIHYDROLIPOAMIDE BRANCHED CHAIN ACYLTRANSFERASE 2*), *IVD* (*ISOVALERYL-COA-DEHYDROGENASE*) und *METHYLCROTONYL-COA-CARBOXYLASE A* und *B* (*MCCA/MCCB*). *BCAT2* katalysiert den ersten Schritt der Degradation von Valin, Leucin und Isoleucin (Diebold et al., 2002). *MCCA*, ist auch am Abbau von Leucin beteiligt (Mentzen et al., 2008) (Vergleich Abbildung 6.17).

PPDK kodiert für die *PYRUVAT ORTHOPHOSPHAT DIKINASE* und katalysiert den Schritt von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat in der Gluconeogenese und spielt somit eine zentrale Rolle im Aminosäureabbau (Carroll et al., 1990).

Tabelle 6.4: **Gene des Aminosäuremetabolismus, die nach 6 h NaCl in der *bzip1/bzip53*-Mutante herunterreguliert sind:** Die Tabelle zeigt die mit dem Aminosäuremetabolismus assoziierten Gene, die in der Microarray Analyse nach 6 h Salzstress differentiell im Vergleich zum Wildtyp zum selben Zeitpunkt herunterreguliert wurden ($> \log_2(0,7)$). Die Tabelle ist nach den verschiedenen Aminosäuren sortiert.

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	p-Wert
BCAA			
AT5G34780	<i>BCDH</i> (Branched-Chain alpha-Keto Acid Dehydrogenase E1 alpha subunit, putative)	-1.52	1E-05
AT1G10070	<i>ATBCAT-2</i> (<i>ARABIDOPSIS THALIANA BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2</i>)	-1.39	2E-06
AT1G03090	<i>MCCA</i> (<i>METHYLCROTONYL-COA CARBOXYLASE</i>)	-1.28	4E-07
AT3G06850	<i>DIN3</i> (<i>DARK INDUCIBLE 3</i>)	-1.13	2E-05
AT3G13450	<i>DIN4</i> (<i>DARK INDUCIBLE 4</i>)	-0.84	1E-05
AT4G34030	<i>MCCB</i> (<i>3-METHYLCROTONYL-COA CARBOXYLASE</i>)	-0.81	1E-07
AT3G45300	<i>IVD</i> (<i>ISOVALERYL-COA-DEHYDROGENASE</i>)	-0.79	1E-04
AT1G55510	<i>BCDH BETA1</i> (<i>BRANCHED-CHAIN ALPHA-KETO ACID DECARBOXYLASE E1 BETA SUBUNIT</i>)	-0.70	4E-05
Tyr			
AT5G54080	<i>HGO</i> (<i>HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE</i>)	-1.26	1E-08
AT5G53970	<i>TAT7</i> (<i>TYROSINE AMINOTRANSFERASE 7</i>)	-1.03	1E-05
AT4G23590	Tyrosine Aminotransferase	-0.74	1E-03
Gln/Asn			
AT3G47340	<i>ASN1</i> (<i>GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1</i>)	-1.19	1E-03
AT5G07440	<i>GDH2</i> (<i>GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2</i>)	-0.73	1E-05

AT3G16150	<i>ASPARAGINASE B1</i>	-0.70	7E-04
Met			
AT1G64660	<i>ATMGL (METHIONINE GAMMA-LYASE)</i>	-1.21	4E-04
Lys			
AT4G33150	lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase bifunctional enzyme	-0.84	2E-06
Pro			
AT3G30775	<i>ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5)</i>	-0.81	1E-05
Thr			
AT1G08630	<i>THA1 (THREONINE ALDOLASE 1)</i>	-0.78	4E-04
Ala			
AT2G13360	<i>AGT1 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANS- FERASE1)</i>	-0.75	1E-03
AT4G39660	<i>AGT2 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANS- FERASE 2)</i>	-0.72	2E-05

Neben den mit dem Aminosäuremetabolismus assoziierten Genen findet man auch Gene, die im Zuckermetabolismus eine Rolle spielen (Tabelle 6.5).

Neben der *PPDK* findet man außerdem noch *FBP (FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE)* unter den herunterregulierten Genen. Beide Gene kodieren für Schlüsselenzyme in der Glukoneogenese (Carroll et al., 1990; Rolland et al., 2006). Dieser Stoffwechselprozess ist bei Kohlenhydratmangel wichtig. Lipide und Proteine werden zu Acetyl-CoA abgebaut, dieses wird über den Glyoxylatzyklus in Succinat umgewandelt und kann somit durch die Glukoneogenese zu Glukose umgewandelt werden.

Zwei weitere Gene werden in der *bzip1/bzip53*-Mutante herunterreguliert. Zum einen findet man *SWEET4*, das zur Familie der Zuckertransporter gehört, über dessen genaue Funktion ist allerdings noch nicht mehr bekannt (Chen et al., 2012; Xuan et al., 2013). Zum anderen wird *SUS4* differentiell reguliert. Es kodiert für eine Saccharose-Synthase und ist im Zusammenhang mit Hypoxia von Pucciariello and Perata (2012) beschrieben worden.

Tabelle 6.5: Gene des Zuckermetabolismus, die nach 3 h bzw. 6 h NaCl in der *bzip1/bzip53*-Mutante herunterreguliert sind: Die Tabelle zeigt die mit dem Zuckermetabolismus assoziierten Gene, die in der Microarrayanalyse nach 3 h bzw 6 h Salzstress differentiell im Vergleich zum Wildtyp zum selben Zeitpunkt herunterreguliert wurden ($> \log_2(0,7)$, P-Wert: 0,01).

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	p- Wert
AT3G43190	<i>SUS4 (SUCROSE SYNTHASE 4)</i>	-1.73	4E-05

AT3G28007	<i>SWEET4</i> putative sugar Transporter, nodulin MtN3 family protein	-1.90	6E-07
AT4G15530	<i>PPDK</i> (<i>PYRUVATE ORTHOPHOSPHATE DIKINASE</i>)	-1.29	8E-04
AT1G43670	<i>FBP</i> (<i>FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE</i>)	-0.95	7E-04
AT5G23660	<i>SWEET2</i> , (<i>HOMOLOG OF MEDICAGO TRUNCATULA MTN3</i>)	-0.93	5E-04
AT1G58180	<i>BCA6</i> (<i>BETA CARBONIC ANHYDRASE 6</i>)	-0.91	2E-06
AT5G57655	xylose isomerase family protein	-0.90	2E-06
AT4G33110	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-0.90	5E-07
AT1G12240	<i>ATBETAFRUCT4</i> (<i>FRUCTOSIDASE 4</i>)	-0.78	9E-03
AT5G18670	<i>BAM9</i> (<i>BETA-AMYLASE 9</i>)	-0.77	8E-05
AT5G20250	<i>RS6</i> (<i>RAFFINOSE SYNTHASE6</i>)	-0.76	4E-04
AT1G63180	<i>UGE3</i> (<i>UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE 3</i>)	-0.75	4E-04

6.3.3 Die Transkriptionsfaktoren bZIP1 und bZIP53 haben eine Funktion im Aminosäureabbau unter Salzstress

Die Transkriptomanalyse von *bzip1/bzip53* nach sechs Stunden Salzstress konnte zeigen, dass viele Gene, die im Aminosäureabbau eine Rolle spielen, differentiell reguliert werden. Das folgende Schema (Abbildung 6.17) zeigt, an welchen Stellen im Aminosäurestoffwechsel diese im Microarray gefundenen Gene eine Rolle spielen.

Die Expression einiger der herunterregulierten Gene, die zum Zeitpunkt 6 h nach Salzstress in der Doppelmutante gefunden wurden (siehe Tabelle 6.4), wurden in Wildtyp, *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* mittels qRT-PCR noch einmal überprüft. Die Quadrupelmutante wird zu den Experimenten hinzugezogen, da zum einen bekannt ist, dass bZIP1 und bZIP53 bevorzugt Heterodimere mit bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C bilden (Weltmeier et al., 2009), zum anderen da in der Phänotyp-Analyse die Keimung auf NaCl diese Mutante besonders beeinträchtigt war (siehe Kapitel 6.2).

Die Abbildungen 6.18 A-F zeigen, dass in allen Genen, die untersucht wurden, die Expression nach Salz in den Mutanten geringer ist als im Wildtyp. Die Expression von *ASN1* ist in der Doppelmutante etwas verringert, in der Quadrupelmutante hingegen ist eine massive Reduktion der Transkription zu sehen. Bei *HGO*, *TAT7*, *MGL* und *MCCA* reicht schon allein das Fehlen von bZIP1 und bZIP53 aus, um deren Transkription signifikant zu beeinträchtigen. Die Quadrupelmutante zeigt hier keine weitere deutliche Reduktion in der Expression.

ASN1 ist das einzige Gen, das differentiell reguliert wird, das in der Aminosäure-Biosynthese eine Rolle spielt. Unter Stressbedingungen ist Asparagin auf Grund seines hohen Stickstoff zu Kohlenstoff-Verhältnisses eine wichtige Aminosäure für den Stick-

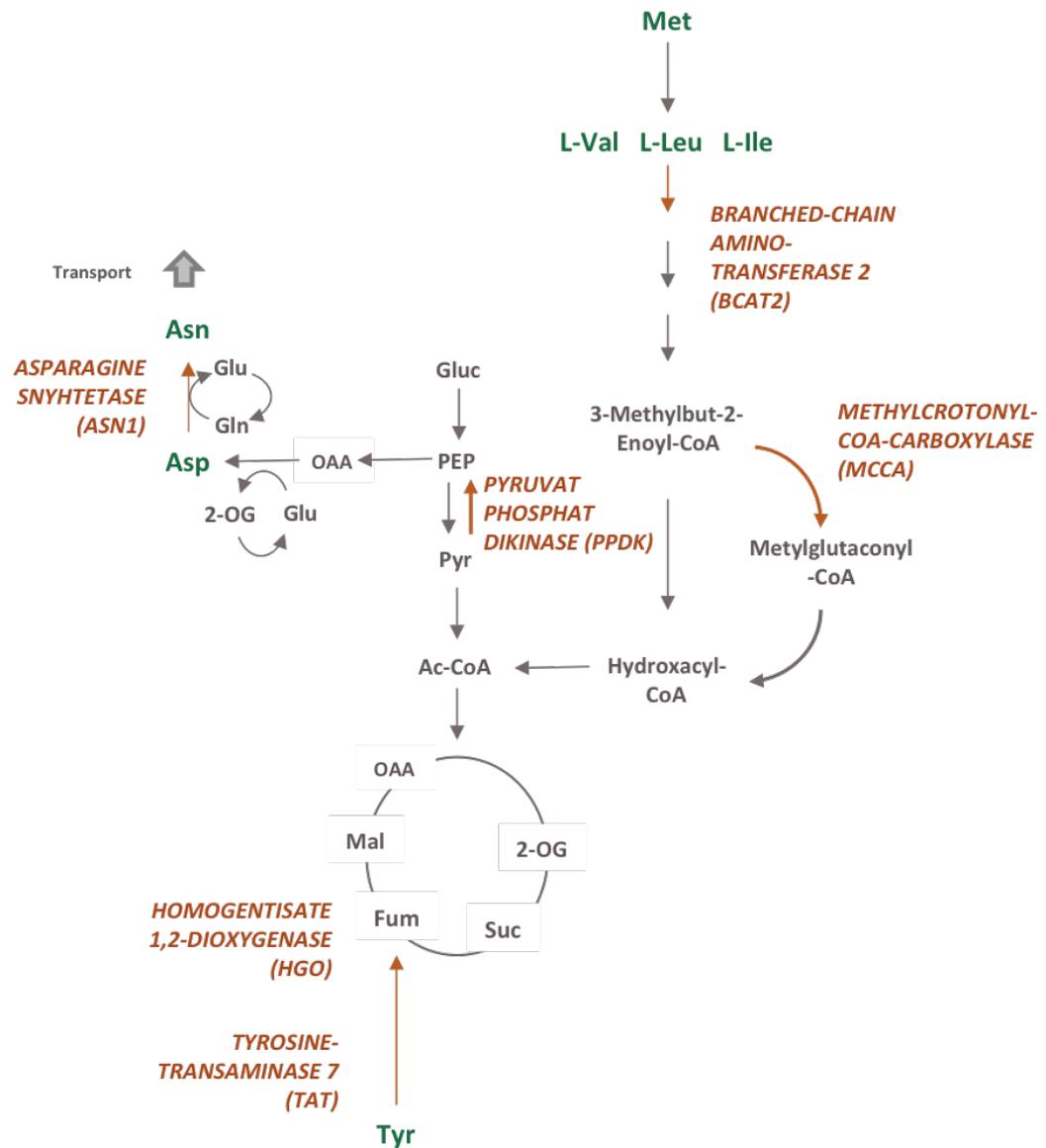
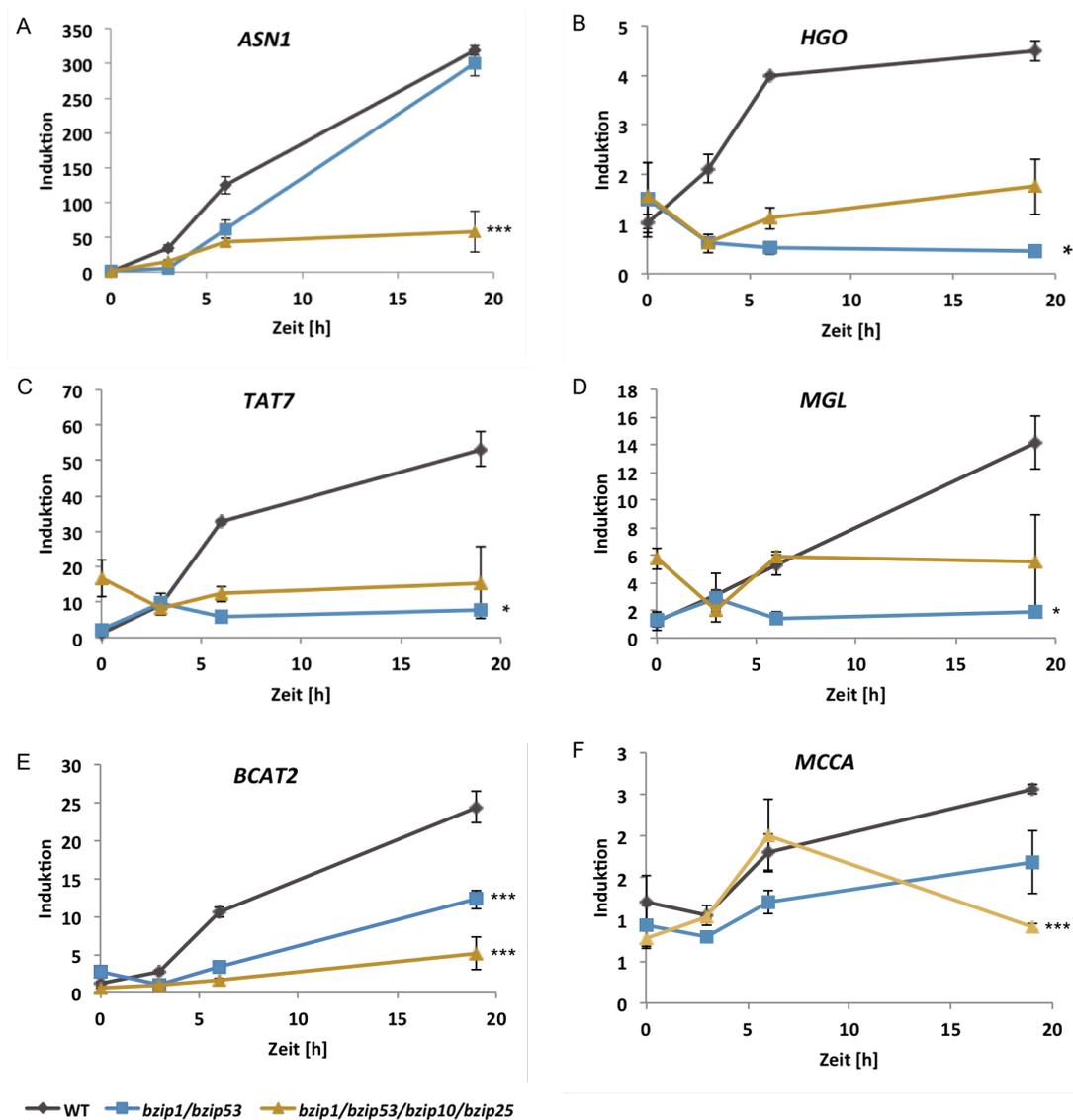


Abbildung 6.17: **Aminosäureabbau:** Stark vereinfachtes Schema zum Aminosäureabbau. Abgebildet sind die Aminosäuren (grün) und die Gene (braun), die in der Degradierung von Aminosäuren eine Rolle spielen. Abgewandelt nach Binder (2010) und Rocha et al. (2010).

stofftransport in der Pflanze. Es ist sehr stabil und eignet sich sowohl zur Speicherung von Stickstoff, als auch für einen Transport über lange Strecken (Lam et al., 1994).

All das spricht dafür, dass bZIP1 und bZIP53 unter Salzstress-Bedingungen eine regulatorische Funktion im Aminosäureabbau einnehmen, und somit eine alternative Energiequelle bereitgestellt wird (Araújo et al., 2011).



Abbildungung 6.18: **Expression von Aminosäuremetabolismus assoziierten Genen nach Salzstress in Wildtyp, *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25***: Wildtyp (grau), *bzip1/bzip53* (blau) und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* (gelb) wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression verschiedener Gene (*ASN1*, *HGO*, *TAT7*, *MGL*, *BCAT2*, *MCCA*) untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=2-3; Fehler: SE; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass auf transkriptioneller Ebene in der *bzip1/bzip53*-Mutante nach Salzstress einige Gene des Zucker- und Aminosäuremetabolismus differentiell reguliert werden als im Wildtyp, wurden nun mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) Aminosäuren gemessen. Dafür wurde Wurzelmaterial sowohl von Wildtyp-Pflanzen als auch aus der *bzip1/bzip53*-Mutante und der Quadruplemutante *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* verwendet.

In den folgenden Abbildungen 6.19 A-E sind ausgewählte Aminosäuren, deren Stoffwechsel von den oben genannten, in qRT-PCR überprüften Genen reguliert wird, gezeigt. Dargestellt ist die Menge der Aminosäure (nm pro mg Frischgewicht) in den drei verschiedenen Pflanzenlinien, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Salz behandelt wurden. Wenn man zunächst nur den Wildtyp betrachtet, fällt auf, dass die Menge aller abgebildeten Aminosäuren bis zum Zeitpunkt 6 h zunächst verstärkt ansteigt und dann relativ konstant bleibt bzw. wieder etwas abnimmt. Man kann daraus schließen, dass als eine Antwort auf den Stress, Proteine abgebaut werden, um Energie zu gewinnen (Fujiki et al., 2001a). Dadurch steigt die Menge einzelner Aminosäuren an.

Sowohl in *bzip1/bzip53* als auch in *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* ist nach drei bis sechs Stunden Salzstress auch ein Anstieg der Aminosäuremenge zu sehen. Aber man kann, besonders bei den verzweigtkettigen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin), deutlich erkennen, dass der Aminosäuregehalt nach den Zeitpunkten 6 h und 24 h NaCl höher ist, als im Wildtyp. In der Transkriptomanalyse (Kapitel 6.3.2) wurde bereits gezeigt, dass viele Gene, die im Aminosäureabbau eine Rolle spielen, nach sechs Stunden herunter reguliert wurden. Die Ergebnisse aus der Metabolitanalyse unterstützen dies. Die Menge an Aminosäuren steigt weiter an, da die Gene, die für die abbauenden Enzyme kodieren, weniger aktiv sind.

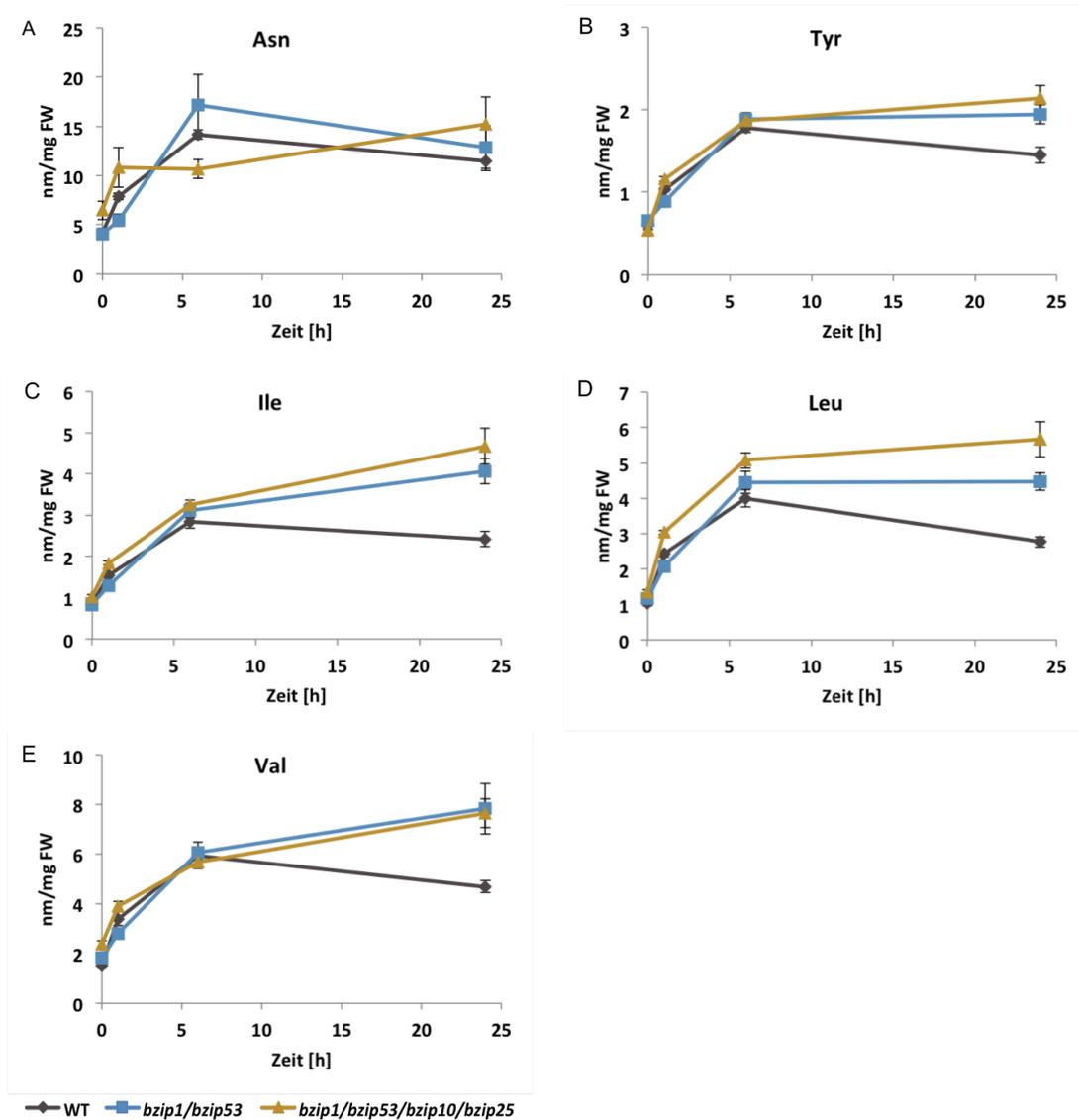


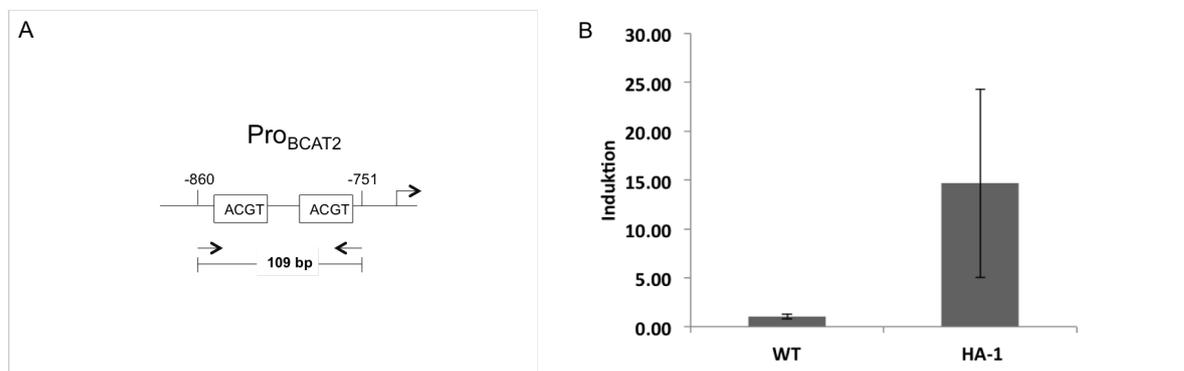
Abbildung 6.19: Messung des Aminosäuregehalts nach Salzstress in Wurzeln von Wildtyp, *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25*: Wildtyp, *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 6 h, 24 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von HPLC wurde die Menge der verschiedenen Aminosäuren gemessen (Agnes Fekete und Jasper Schierstaedt, Universität Würzburg). Dargestellt sind die Aminosäuremengen in nm pro mg Frischgewicht. (n=5; Fehler: SE)

6.3.3.1 bZIP1 bindet den *BCAT2*-Promotor *in vivo*

Die Metabolit- und Array-Daten sprechen dafür, dass bZIP1 in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel im Stoffwechsel der verzweigt-kettigen Aminosäuren eine Rolle spielt. Um zu untersuchen, ob dieses nur indirekte Effekte sind, oder ob bZIP1 direkt an Promotoren von BCAA-Genen bindet, wurden CHIP-Experimente durchgeführt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bZIP1 unter Energieverarmung im Blatt direkt an den *ASN1*-Promotor bindet (Dietrich et al., 2011).

Die Experimente wurden mit Wildtyp und bZIP1-Überexprimierern (Pro35S:HA-AtbZIP1) durchgeführt. Mittels ChIP-Experiment wurde der *BCAT2*-Promotor getestet. In diesem Promotor befinden sich viele ACTG-Motive (bZIP-Bindemotive) (Schindler et al., 1992; Sibénil et al., 2001). In den ersten 1500 bp findet man allein sechs Motive. Für die Experimente wurde ein Primerpaar gewählt, dass ein 109 bp großes Fragment amplifiziert, dass zwei ACTG-Motive enthält.

Nach der Immunopräzipitation sieht man deutlich, dass dieses Promotorfragment in den Pro35S:HA-AtbZIP1-Wurzeln deutlich angereichert ist. Das spricht für eine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor. Dieser Versuch ergänzt die vorherigen Ergebnisse, dass in *bzip1*-Mutanten die Expression von *BCAT2* deutlich reduziert ist (6.3.2). Aus zeitlichen Gründen konnte dieser Versuch nur ein Mal durchgeführt werden.



Abbildungung 6.20: **bZIP1 bindet direkt an den *BCAT2*-Promotor:**

A: Schema des *BCAT2*-Promotors (Pro_{BCAT2}) mit zwei benachbarten ACTG-Elementen. Die Pfeile geben die Position der Primer für die Amplifikation des 109 bp großen Fragments an.

B: Wildtyppflanzen (Col-0) und die Überexpressionslinie Pro35S:HA-AtbZIP1 wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen. Nach der Immunopräzipitation mit einem ChIPgrade HA-Antikörper wurde eine qPCR der aufgereinigten DNA mit Primern durchgeführt, die das Fragment des *BCAT2*-Promotors mit den zwei ACTG-Motiven umfassen. Dargestellt ist die Anreicherung dieses Fragments im Vergleich zum Wildtyp mit Abgleich mit Inputkontrolle und einem unspezifischen *Actin*-Gen. (n=2; Fehler: SE)

6.3.4 Die *bzip1/bzip53*-Mutante spielt eine Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel

Neben den Aminosäuren wurde auch der Zuckerhaushalt im Wurzelmaterial der drei Linien nach Salzstress analysiert. Diese Ergebnisse zeigen, ähnlich wie die Aminosäuremessung, deutliche Effekte der Stoffwechselumprogrammierung sowohl im Wildtyp als auch in der *bzip1/bzip53*-Mutante.

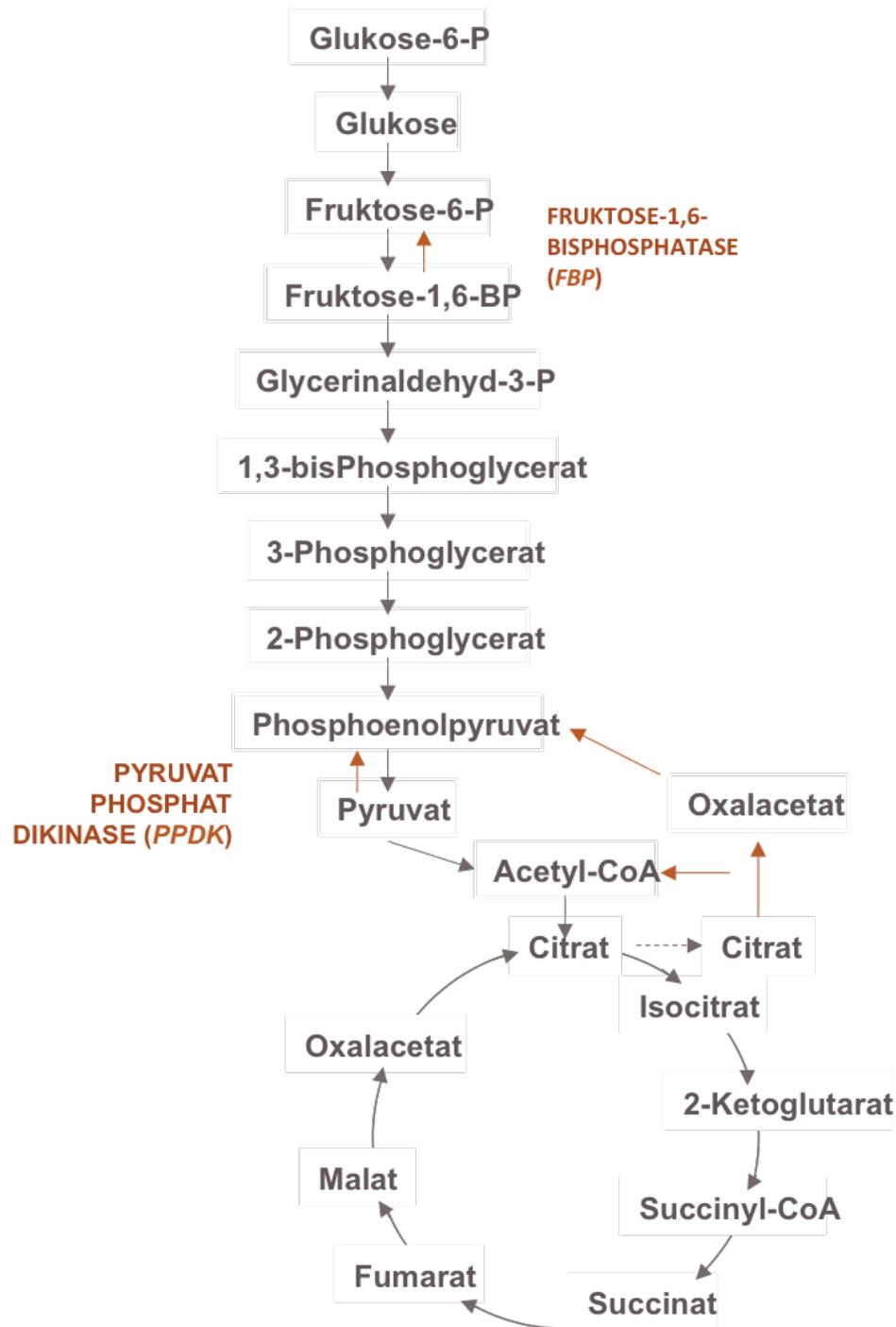


Abbildung 6.21: **Glukoneogenese:** Stark vereinfachtes Schema zur Glukoneogenese (bzw. Glykolyse) und zum Citratzyklus. Die Proteine, deren Gene auch im Array gefunden wurden, sind braun dargestellt.

Wie schon in Kapitel 6.3.1 dargestellt, werden im Wildtyp nach 3 h bzw. 6 h einige Gene des Kohlenhydratstoffwechsels verstärkt induziert. Unter anderem sind *SUS1*, *SUS3*, *SUS4*, *SPS2F*, *SUC2*, *SPP2* und *PPDK* zu finden. In der *bzip1/bzip53*-Mutante ist zu beobachten, dass die Expression einiger dieser Gene reduziert ist. Die Expression dieser Gene nach Salzstress wurde zusätzlich noch in qRT-PCR überprüft.

In der Abbildung 6.22 wird veranschaulicht, dass die Expression von *SUS4* im Wildtyp nach Salzstress bereits nach drei Stunden signifikant verstärkt ist. Im Laufe der Zeit nimmt die Expression aber wieder ab und nähert sich dem geringen Expressionsniveau der beiden Mutanten an. Auch die Expression von *FBP* steigt im Wildtyp bis zum Zeitpunkt 6 h schnell an und bleibt dann konstant. Die Expression in den Mutanten steigt auch an, aber deutlich langsamer und schwächer als im Wildtyp. Die Expression von *PPDK* zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom C/S1-Netzwerk. Im Wildtyp steigt die Expression deutlich an, in der Doppelmutante ist bereits eine merklich ausgeprägte Reduktion der Expression zu sehen. In der Quadrupelmutante ist aber die Expression der *PPDK* kaum noch zu erkennen. Bei *SWEET4* ist lediglich eine Tendenz zu erkennen, dass die Expression im Wildtyp höher ist, als in den Mutanten. Allerdings sprechen die Array-Daten für eine differentielle Regulation (siehe Tabelle 6.5).

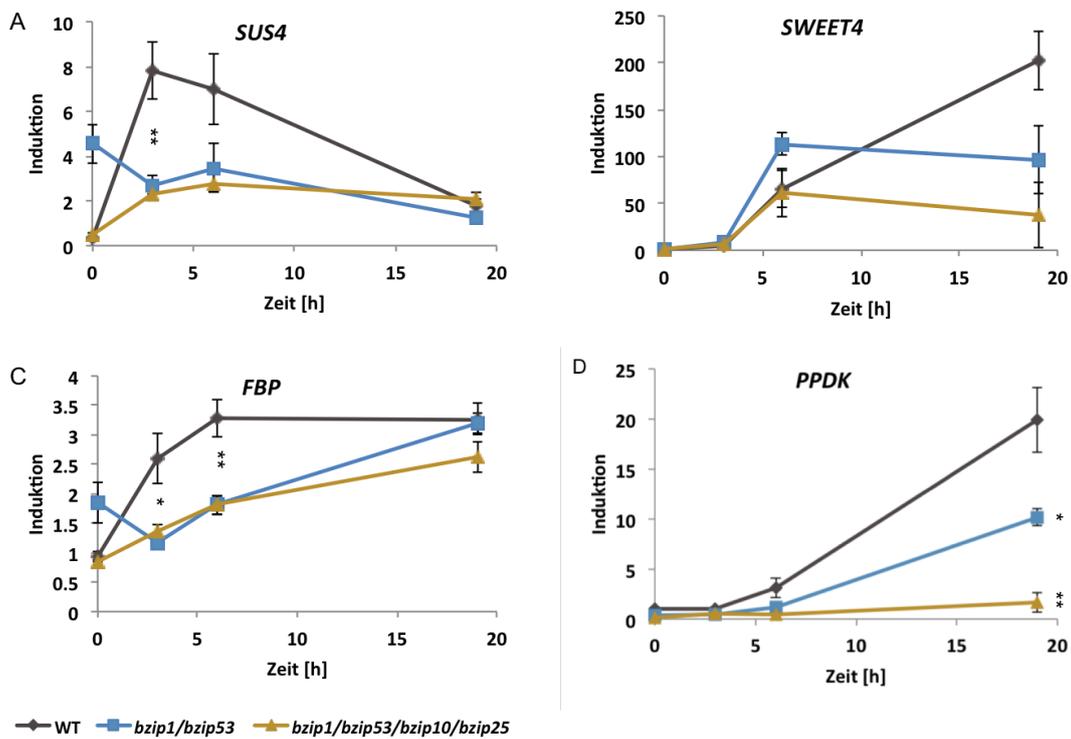


Abbildung 6.22: **Expression von bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppen C und S1 in Blatt und Wurzel nach Salzstress:** Wildtyppflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurden die Expression der verschiedenen Gene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbelastetem Wurzelmaterial von *SUS4* (A), *SWEET4* (B), *FBP* (C) sowie *PPDK* (D) nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=2-3; Fehler: SD; T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Die Expression der *PPDK*, die ein zentrales Gen im Aminosäure- und Zuckermeta-

lismus darstellt, wurde zusätzlich auch noch mittels qRT-PCR in einer *bZIP1*-Überexpressionspflanze (Pro35S:HA-*bZIP1*) getestet. Hier ist die Abhängigkeit der Gens von *bZIP1* deutlich dargestellt. In der Überexpressionslinie ist ein stärkerer Anstieg der Expression nach Salz zu erkennen, als im Wildtyp. Die geringere Expression im Wildtyp in diesem Versuch als im vorherigen (Abbildung 6.18) lässt sich damit erklären, dass dort die Pflanzen in Hydroponik angezogen wurden, in diesem Versuch stammt das Wurzelmaterial jedoch von drei Wochen alten Pflanzen, die auf Platte angezogen wurden.

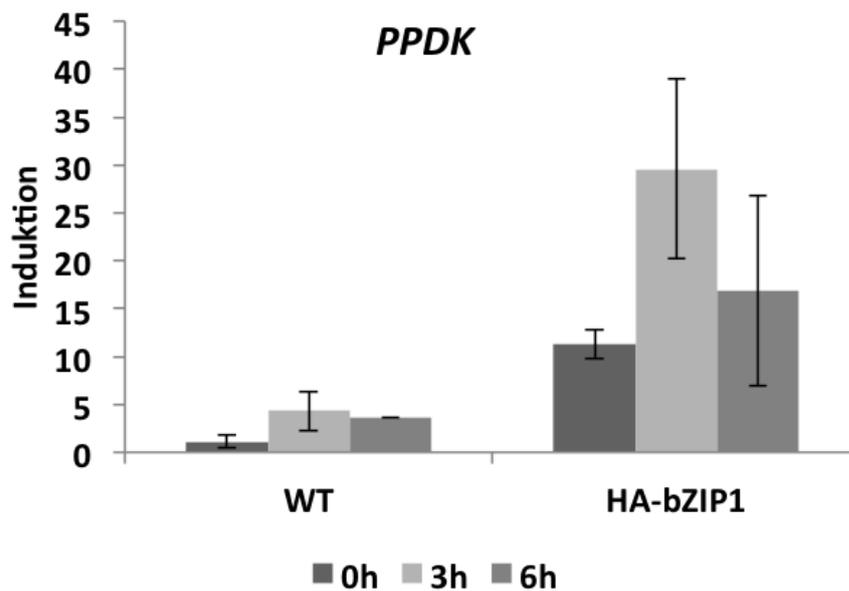


Abbildung 6.23: Expression von *PPDK* nach NaCl in Wildtyp und transgenen HA-*bZIP1*-Überexpressionslinien: Wildtyp, und HA-*bZIP1*-Pflanzen wurden drei Wochen lang auf MS-Agar-Platten (Lichtbedingungen 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) angezogen. Die Pflanzen wurden 6 h bzw. 3 h lang mit 250 mM NaCl behandelt und dann die Wurzeln gleichzeitig zum Zeitpunkt 0 h geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression von *PPDK* untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5*. (n=3, Fehler: SD)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach Salzstress viele Gene, die im Zuckermetabolismus eine Rolle spielen im Salzstress hochreguliert wurden bzw. in den *bzip1/bzip53*-Pflanzen weniger stark exprimiert wurden, wurde der Zuckergehalt der mit Salz behandelten Pflanzen mittels HPLC analysiert. Der vollständige Datensatz dafür befindet sich im Anhang, Tabelle 8.5.

Bis auf Glukose-6-Phosphat steigt der Zuckergehalt im Wildtyp bis zum Zeitpunkt 6 h an. Die Menge an Fruktose, Glukose und Saccharose nimmt dann wieder ab. Glukose-6-Phosphat wird im Wildtyp nach drei Stunden Salzstress zunächst weniger, nimmt dann wieder zu, aber von den Zeitpunkten 6 h bis 24 h langsam wieder ab.

Im Wurzelmaterial von den *bzip1/bzip53*-Pflanzen ist die Menge aller Zucker zum ungestressten Zeitpunkt 0 h größer als im Wildtyp. Bei Fruktose und Saccharose sieht man auch eine Zunahme bis zum Zeitpunkt 6 h, danach wieder eine Reduktion. Die Menge von Glukose und Glukose-6-Phosphat hingegen nimmt nach NaCl-Gabe direkt ab. Die Unterschiede in der Menge der verschiedenen Zucker spiegelt gut die unterschiedliche Expression der oben genannten Gene wieder.

Zucker wie Raffinose dienen als kompatible Osmolyte. Die Synthese dieser Verbindungen ist eine Anpassung der Pflanze an Salzstress (Krasensky and Jonak, 2012). Während man im Wildtyp einen stetigen Anstieg der Raffinose-Menge nach Salzstress beobachtet, nimmt in der *bzip1/bzip53*-Mutante die Menge an Raffinose nach 6 h Salzstress wieder ab. Dazu passt die in der Microarray-Analyse gefundene reduzierte Induktion der *RAFFINOSE SYNTHASE (DIN10)*.

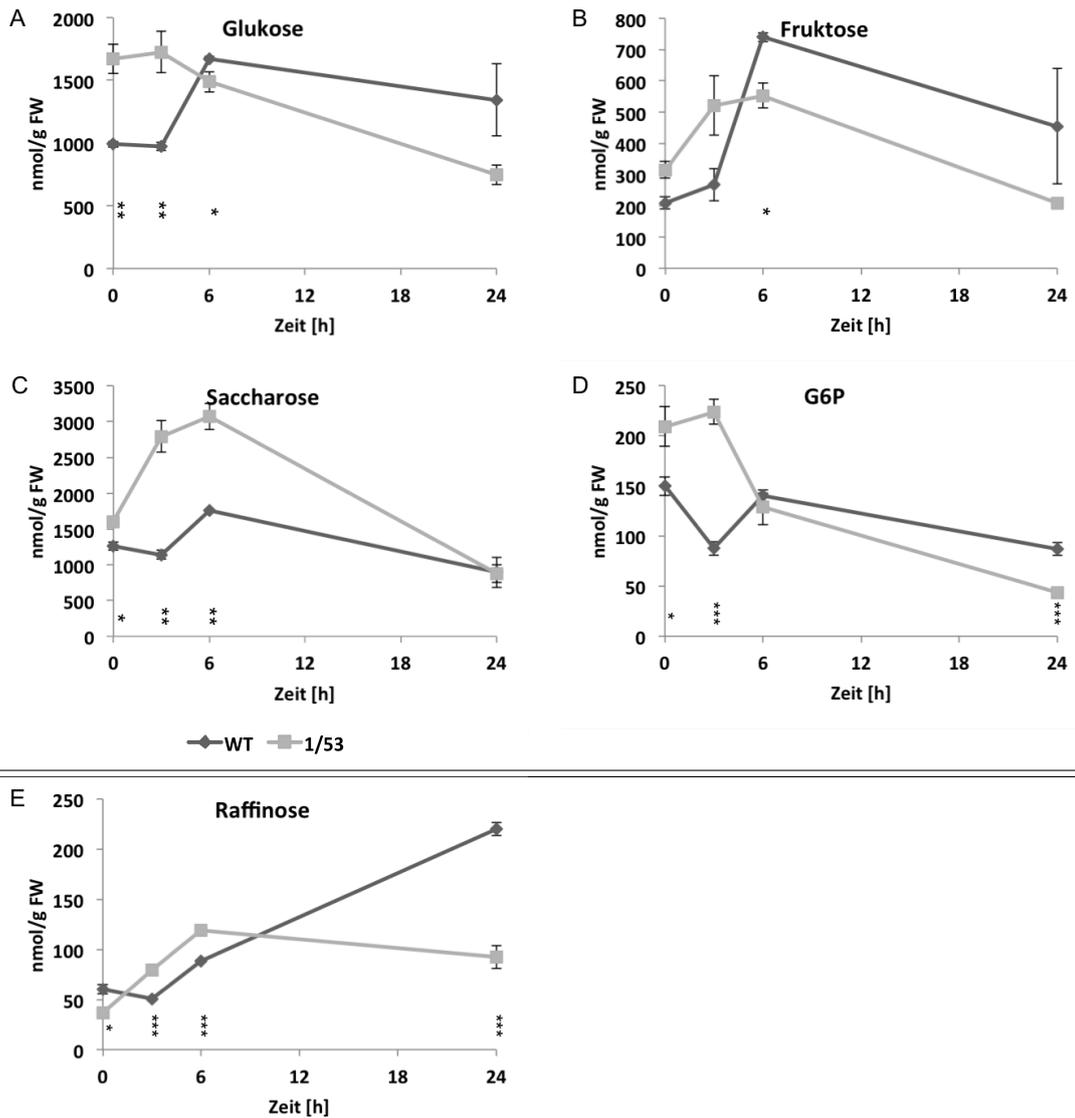


Abbildung 6.24: Menge verschiedener Zucker in der Wildtyp- und *bzip1/bzip53*-Wurzel nach Salzstress: Wildtyp (schwarz) und *bzip1/bzip53* (grau) wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 24 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von HPLC wurde die Menge der verschiedenen Zucker gemessen (Markus Krischke, Universität Würzburg). Dargestellt ist die Menge der Zucker in nmol/g FW. (n=3, Fehler: SD, T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

6.4 bZIP1 ist Teil eines regulatorischen Signaltransduktionsnetzwerks nach abiotischem Stress

Durch die bereits gezeigten Ergebnisse leitet sich ab, dass bZIP1 und bZIP53 maßgeblich an der metabolischen Anpassung der Pflanze an Salzstress beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass bZIP1 unabhängig vom ABA-SnRK2-AREB-Signaltransduktionsweg zu sein scheint (6.1.3.2). Jedoch wurden in der Microarrayanalyse einige Gene gefunden, die in der *bzip1/bzip53*-Mutante nach 6 h Salzstress herunterreguliert wurden, die beschrieben sind, in der Antwort auf abiotischen Stress eine Rolle zu spielen, wie z. B. *DIN2* (*DARK INDUCIBLE 2*), *SEN1* (*SENESCENCE ASSOCIATED GENE 1*), *EARLI1* (*EARLY ARABIDOPSIS ALUMINUM INDUCED 1*), *RD29B* (*RESPONSIVE TO DESSICATION 29B*) (Fujiki et al., 2001b; Azumi and Watanabe, 1991; Wilkosz and Schläppi, 2000; Msanne et al., 2011). Von denen sind z.B. *EARLI1* und *RD29B* bekannt, dass sie durch ABA aktiviert werden (Oh et al., 1996; Zimmermann et al., 2004; Nemhauser et al., 2006; Toufighi et al., 2005).

In den folgenden Experimenten wurde die Expression der im Array gefundenen Gene in den ABA-zugehörigen Mutanten *snrk2.2/anrk2.3/snkr2.6*, *areb1/areb2/abf3* und *aba2* nach Salzstress getestet, um ein mögliches Zusammenspiel dieser Signaltransduktionswege zu analysieren. Nach den durchgeführten qRT-PCRs konnten die untersuchten Gene in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden.

Die Klasse 1 setzt sich aus den Genen zusammen, deren Transkription von den bZIPs der Gruppe A reguliert wird. Die Expression im Wildtyp nach Salz ist verstärkt, jedoch in den drei Mutanten des ABA-Signaltransduktionswegs ist keine Expression mehr zu erkennen. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem *EARLI1* und *LEA76*. Die Expression dieser Gene wurde zusätzlich in salzbehandeltem Wurzelmaterial von Wildtyp, *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* mittels qRT-PCR überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gene sowohl im Wildtyp als auch in den der Doppel- und Quadrupelmutante exprimiert werden. Außerdem beginnt die Expression schon viel früher, als bei *bZIP1*. Somit sind sie keine Zielgene von bZIP1. Die verringerte Expression, die im Array gezeigt wurde, wurde also durch indirekte Effekte hervorgerufen.

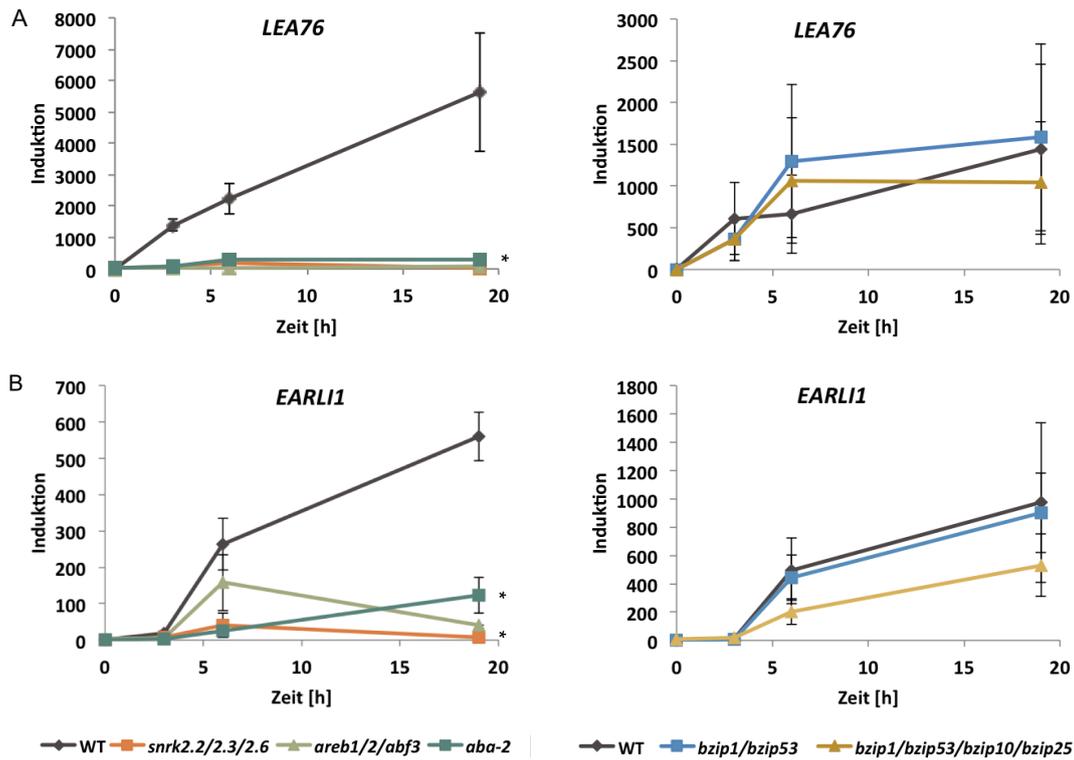


Abbildung 6.25: Expression der Klasse 1-Gene in Mutanten des ABA-Signaltransduktionswegs, sowie des C/S1-Netzwerks nach Salzstress: Wildtyp, *aba2*, *snrk2.2/2.3/2.6* und *areb1/areb2/abf3*, sowie *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression der verschiedenen Gene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5* von *LEA76* (A) und *EARL11* (B). (n=2-3, Fehler: SE, T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Zu der Klasse 2 gehören nach dieser Aufteilung die Gene *MCCA* und *BCAT2*, die am Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren beteiligt sind. Die Expression in den ABA-Signalweg-Mutanten zeigt, dass die Expression beider Gene unabhängig von ABA2 sind. In den Mutanten *snrk2.2/2.3/2.6*- und *areb1/areb2/abf3* ist jedoch eine verringerte oder keine Expression von *BCAT2* oder *MCCA* zu sehen. In den bZIP-Mutanten ist die Expression beider Gene ähnlich, Doppel- bzw. Quadrupelmutante zeigen eine verringerte Expression, aber kaum Unterschiede. Das Fehlen von *bZIP1* und *bZIP53* reicht schon aus, um die Transkription deutlich einzuschränken. Die Expression scheint sowohl von bZIPs der Gruppe A, als auch von der Gruppe S1 reguliert zu werden.

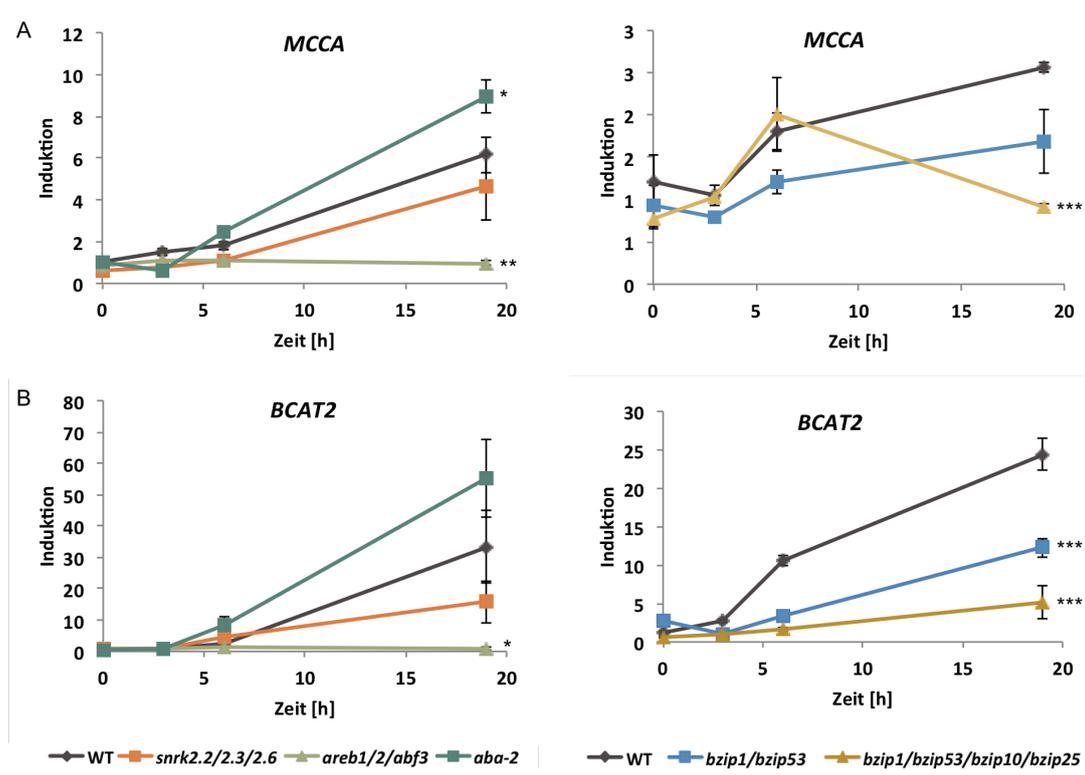


Abbildung 6.26: Expression der Klasse 2-Gene in Mutanten des ABA-Signaltransduktionswegs, sowie des C/S1-Netzwerks nach Salzstress: Wildtyp, *aba2*, *snrk2.2/2.3/2.6* und *areb1/areb2/abf3*, sowie *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression der verschiedenen Gene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5* von *MCCA* (A) und *BCAT2* (B). (n=2-3, Fehler: SE, T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Die Gene *TAT7* und *HGO*, spielen eine Rolle im Tyrosin-Abbau (siehe Abbildung 6.17). Beide Gene lassen sich der Klasse 3 zuordnen. Die Expression dieser Gene ist unabhängig von den bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe A. Außerdem geht daraus hervor, dass, wie bei den Genen der Klasse 2, nur eine Abhängigkeit von den Genen der Gruppe S1 vorliegt. Die Quadrupelmutante zeigt ein ähnliches Expressionsmuster, wie die Doppelmutante.

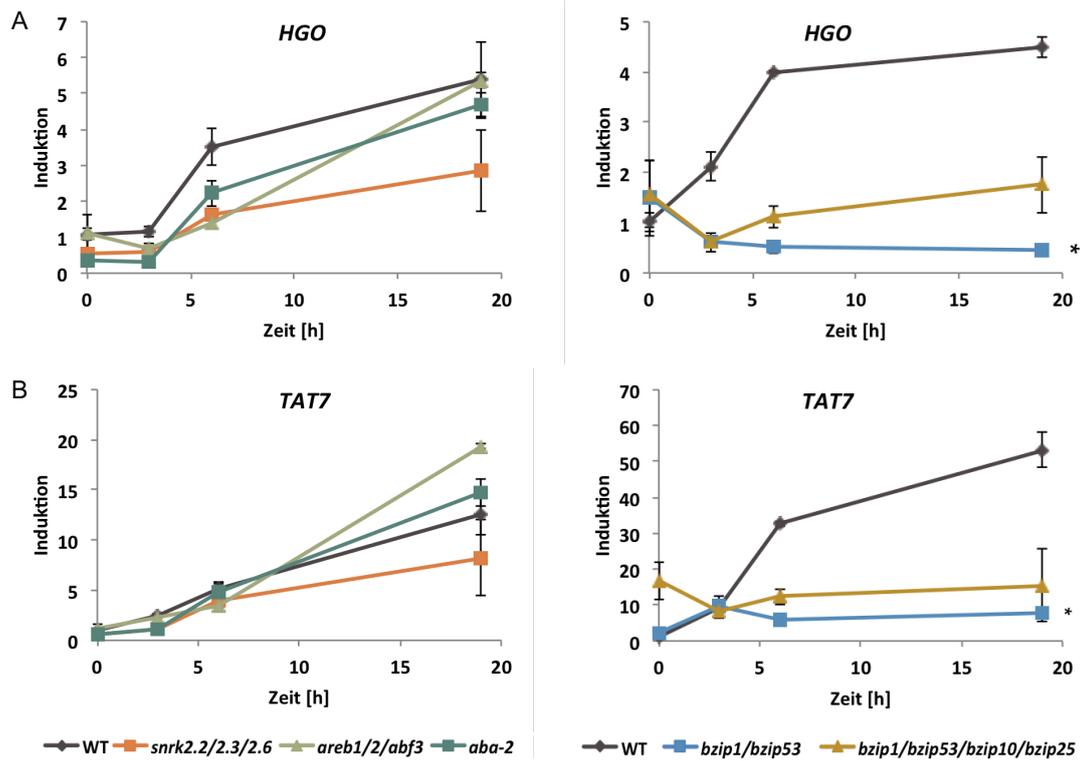


Abbildung 6.27: Expression der Klasse 3-Gene in Mutanten des ABA-Signaltransduktionswegs, sowie des C/S1-Netzwerks nach Salzstress: Wildtyppflanzen, *aba2*-, *snrk2.2/2.3/2.6*- und *areb1/areb2/abf3*-Pflanzen, sowie *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression der verschiedenen Gene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5* von *HGO* (A) und *TAT7* (B). (n=2-3, Fehler: SE, T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Zu der letzten Gruppe, Klasse 4 gehören *ASN1* und *PPDK*. Die Expression dieser Gene ist abhängig von den C/S1-bZIP-Transkriptionsfaktoren. Wie schon vorher gezeigt, ist die Expression in der Doppelmutante *bzip1/bzip53* verringert, in der Quadrupelmutante *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* jedoch deutlich eingeschränkt. Nach der Analyse der ABA-Signalweg-Mutanten kann keine Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktoren der Gruppe A festgestellt werden. Interessanterweise ist aber eine Abhängigkeit von den SnRK2 festzustellen.

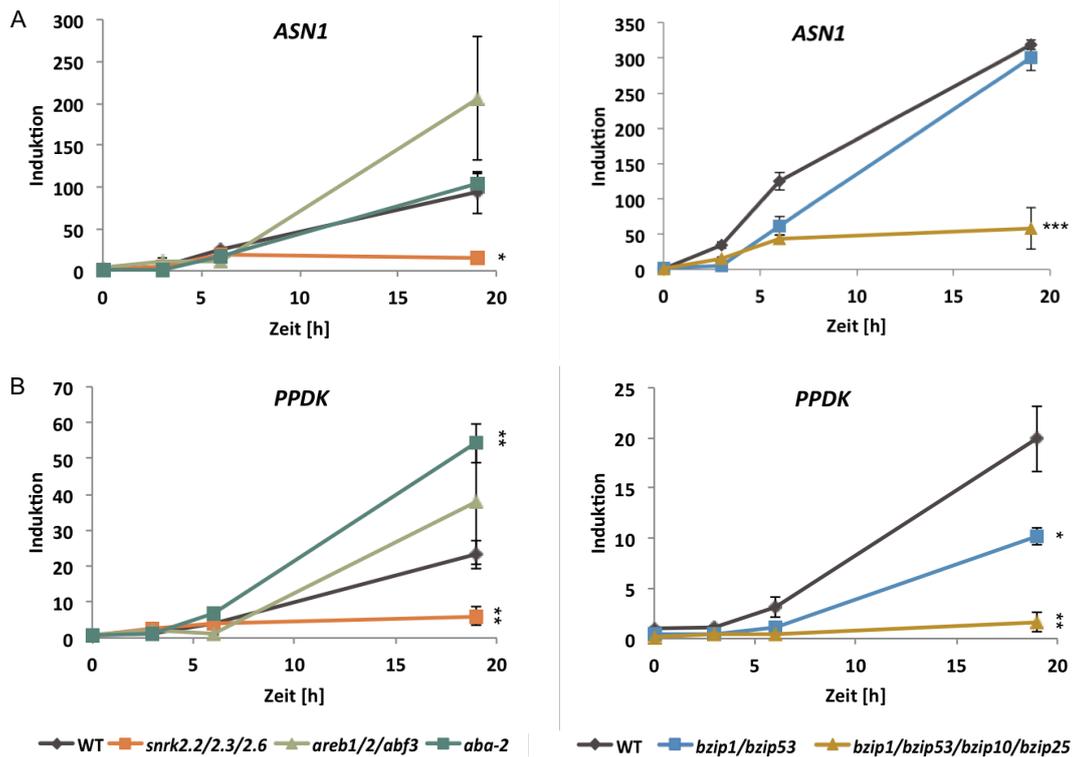


Abbildung 6.28: Expression der Klasse 4-Gene in Mutanten des ABA-Signaltransduktionswegs, sowie des C/S1-Netzwerks nach Salzstress: Wildtyp, *aba2*, *snrk2.2/2.3/2.6* und *areb1/areb2/abf3* Pflanzen, sowie *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Expression der verschiedenen Gene untersucht. Dargestellt sind die relativen Werte im Vergleich zur Expression von unbehandeltem Wurzelmaterial nach Abgleich mit dem Haushaltsgen *UBQ5* von *ASN1*. (n=2-3, Fehler: SE, T-Test: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

7 Diskussion

In dieser Arbeit soll herausgearbeitet werden, welche Rolle bZIP1 und bZIP53 in der Antwort auf Salzstress in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel spielen. Dabei wurde zunächst betrachtet, welche Signaltransduktionskaskaden an der transkriptionellen Aktivierung von *bZIP1* beteiligt sind, außerdem welchen Einfluss die Transkriptionsfaktoren auf die transkriptionelle sowie auf die metabolische Anpassung der Pflanze an Salzstress haben und wie bZIP1 Teil der Verknüpfung verschiedener Stressantworten ist.

Es ist bereits bekannt, dass die Expression von *bZIP1* und *bZIP53* nach Salzstress gewebespezifisch induziert wird und somit nur in den Wurzeln und nicht in den Blättern vorkommt. Daher wurde in dieser Arbeit nur das Wurzelmaterial untersucht.

7.1 Verschiedene stress- und energieabhängige Signale werden auf dem *bZIP1*-Promotor vereint

Die Expression von *bZIP1* wird in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel sowohl durch ionische als auch durch osmotische Stimuli induziert. Dieser Effekt ist spezifisch für die Wurzeln, da im Blatt keine bZIP1-Expression nach Salz oder osmotischem Stress gezeigt werden kann. Auffällig ist, dass die Induktion des Transkriptionsfaktorgens, unabhängig vom Stimulus, sehr langsam geschieht. Es können zwar Unterschiede in der Expressionsstärke gezeigt werden, aber erst nach drei bis sechs Stunden lässt sich eine deutliche Expressionszunahme erkennen. Andere bekannte stressresponsive Gene, wie z.B. *RD29B* (Msanne et al., 2011) oder Transkriptionsfaktoren (siehe Anhang Tabelle 8.1) werden deutlich früher induziert. Daraus lässt sich schließen, dass die Transkription nicht direkt durch die Zugabe von Salz induziert wird, aber indirekt über Signalwege, die durch den Salzstress aktiviert werden. Sun et al. (2012) konnten zeigen, dass die Überexpression von *bZIP1* zu einer erhöhten Toleranz bezüglich Salz, Trockenheit und osmotischem Stress führt. Die *bzip1*-Mutanten hingegen zeigten eine stärkere Anfälligkeit für diese Stresse, was bestätigt, dass bZIP1 eine wichtige Rolle in der durch Salz induzierten Signaltransduktion spielt.

Es ist bekannt, dass hohe Salzkonzentrationen in der Zelle zu einem cytosolischen Calcium-Einstrom führen (Kaplan et al., 2006; Laohavisit et al., 2013). Die alleinige Gabe von W7, einer organisch-chemischen Verbindung, die in der Zelle zu Ca^{2+} -Antworten

führt, löst eine Induktion von *bZIP1* aus, der Calciumkanalblocker LaCl_3 hingegen führt in Kombination mit NaCl zu einer verringerten Induktion. Calcium wird also in der Signalkaskade zur transkriptionellen Aktivierung von *bZIP1* durch Salz benötigt.

Wie schon erwähnt, wird die Expression *bZIP1* in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* nicht durch Salz oder osmotischen Stimulus induziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Energieverarmung, z.B. durch Dunkelinduktion, die Transkription aktiviert (Dietrich et al., 2011). Durch zusätzlich zugeführte Glukose kann diese Expression auch wieder inhibiert werden (Kang et al., 2010). Diese Inhibierung ist von der HEXOKINASE1 (HXK1) abhängig, die eine der Hauptsensoren für Glukose ist (Moore et al., 2003). In der HXK1-Mutante *gin2* (*glucose insensitive 2*) konnte z.B. nach Glukosegabe *bZIP1* in dunkelinduzierten Blättern detektiert werden, wobei im Wildtyp die dunkelinduzierte Expression von *bZIP1* durch Glukose inhibiert wird. In der Wurzel hingegen ist die salzinduzierte Transkription von *bZIP1* abhängig von der HXK1. In der *gin2*-Mutante kann nach Salzstress nur noch eine geringe *bZIP1*-Expression detektiert werden. Zudem kann man in einer Analyse der Zuckermengen nach Salzstress sehen, dass im Wildtyp die Menge an Glukose und Glukose-6-Phosphat bis zum Zeitpunkt 6 h deutlich zunimmt. In der *gin2*-Mutante sind die Mengen der Zucker bereits im ungestressten Zustand sehr hoch, die Menge an Glukose-6-Phosphat nimmt mit dem Salzstress ab. Es ist zu vermuten, dass die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat durch die HXK1 ein wichtiges metabolisches Signal darstellt, das den Energiezustand der Pflanze widerspiegelt und somit auf die Transkription von *bZIP1* wirkt. Es ist nicht bekannt, wie das von der HXK1 wahrgenommene Signal die Transkription von *bZIP1* beeinflusst. Die HXK1 ist im Nukleus lokalisiert und kann somit direkt an der Regulation von Zielgenen beteiligt sein (Cho et al., 2006). Zudem ist bekannt, dass in Keimlingen die Signaltransduktion nach hoher Glukosekonzentration mit der ABA-Signaltransduktion interagiert (Cho et al., 2010). Hier könnte getestet werden, welche Auswirkungen die externe Applikation von ABA auf die Transkription von *bZIP1* in der *gin2*-Mutante hat, um weitere Zusammenhänge der Signaltransduktion zu überprüfen.

Da die pflanzliche Antwort auf Stress sehr energieaufwendig ist, wird vermutet, dass hohe Salzkonzentrationen zu Energieverarmung führen (Jacoby et al., 2011; Araújo et al., 2011). Die SnRK1-Kinasen KIN10 und KIN11 spielen eine Rolle bei der Wiederherstellung des pflanzlichen Gleichgewichts bei Energiemangelbedingungen. Wie der Stress durch Energiemangel wahrgenommen wird, bzw. wie dadurch die SnRK1-Kinasen reguliert werden, ist noch nicht bekannt (Baena-González and Sheen, 2008). Die durch KIN10 und KIN11 veränderte Genexpression, soll teilweise durch *bZIP*-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 vermittelt werden (Baena-Gonzalez et al., 2007; Hanson et al., 2008). Zum Beispiel konnte in Protoplasten ein synergistischer Effekt von KIN10 und *bZIP1* bei der Aktivierung eines ProASN1:LUC-Reporterkonstrukts

gezeigt werden. Da die Expression von *bZIP1* durch Energiemangel induziert wird, wird vermutet, dass *bZIP1* von SnRK1 reguliert wird (Baena-Gonzalez et al., 2007). In Salzstress-Versuchen mit einer β -Estradiol induzierbaren artificial micro RNA (*ami-kin11*) in einem *kin10*-Hintergrund (*kin10/ami-kin11*) konnte nachgewiesen werden, dass beide SnRK1-Kinasen notwendig für eine salzinduzierte Transkription von *bZIP1* sind. Auch wenn es noch nicht gezeigt werden konnte, wird vermutet, dass die Kinasen unter anderem Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von *bZIP1* regulieren und somit zur Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an Energiemangel beiträgt, phosphorylieren.

ABA ist ein Phytohormon, das eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion nach verschiedenen Stressen spielt (Leung and Giraudat, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Sowohl die Transkription von *bZIP1* als auch die von *bZIP53* kann durch extern appliziertes ABA aktiviert werden. Allerdings ist die Induktion von *bZIP1* und von *bZIP53* unabhängig von der ABA-Biosynthese. Die *aba2*-Mutante zeigt nach Salzstress eine gleichstarke Induktion beider Transkriptionsfaktoren, wie der Wildtyp. Die Expression scheint also über einen anderen Signalweg aktiviert zu werden. Rodrigues et al. (2013) konnten kürzlich zeigen, dass die *clade A* PP2Cs, ABI1 und PP2CA, nicht nur negative Regulatoren von SnRK2-Kinasen sind, sondern auch direkt mit der katalytischen Untereinheit von SnRK1-Kinasen interagieren, sie dephosphorylieren und somit inaktivieren. Durch die Inhibierung der PP2C durch ABA kann also auch SnRK1 aktiviert werden, was dann eine Aktivierung von *bZIP1* zur Folge haben kann. Zudem führen erhöhte ABA-Konzentrationen zu einem Anstieg von cytosolischem Ca^{2+} . Beides spricht für eine Interaktion des SnRK1-Signaltransduktionsweges nach Energieverarmung mit dem ABA-induzierten Signaltransduktionsweg nach abiotischem Stress.

Die Induktion der *bZIP1*-Transkription wird von vielen verschiedenen Einflüssen reguliert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl Calcium, Zucker und die SnRK1-Kinasen unabhängig voneinander auf den *bZIP1*-Promotor wirken. Die genaue Aktivierung des Promotors ist noch unklar, jedoch sprechen die Ergebnisse dafür, dass ein komplexes Netzwerk oberhalb der Regulation des *bZIP1*-Promotors steht. Um eine genaue Regulierung zu bestimmen, sollte z.B. die Transkription von *bZIP1* in der SnRK1-Mutante *kin10/ami-kin11* nach ABA-Gabe untersucht werden, sowie im Wildtyp nach ABA in Kombination mit dem Ca^{2+} -Kanalblocker LaCl_3 .

7.2 Nach Salzstress sind bZIP1 und bZIP53 Teil der Reprogrammierung des Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus in der *Arabidopsis thaliana*-Wurzel

Vieles deutet darauf hin, dass bZIP1 und bZIP53 eine bedeutende Rolle in der pflanzlichen Antwort auf Stress spielen. So konnte bei langanhaltender Dunkelheit bereits nach vier Stunden eine deutliche Steigerung der Expression von *bZIP1* und eine etwas geringere von *bZIP53* beobachtet werden. In der Pflanze herrscht zu diesem Zeitpunkt Energiemangel, da Stärke als Energiespeicher bereits aufgebraucht ist (Usadel et al., 2008). Bereits kleine Abweichungen im Energiezustand, die durch verlängerte Nacht hervorgerufen werden, führen zu einer transkriptionellen Aktivierung von *bZIP1* und *bZIP53* im oberirdischen Teil von *Arabidopsis*. Daher wurden die Transkriptionsfaktoren von Usadel et al. (2008) nach einer Transkriptom-Analyse in dunkelinduzierten Blättern bereits beschrieben, eine mögliche regulatorische Rolle in der Anpassung an Energiemangel einzunehmen. Zudem wird *bZIP1* circadian transkriptionell reguliert (Gutiérrez et al., 2008). Für CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1), einer Hauptkomponente der inneren Uhr (Yakir et al., 2007), konnte mittels ChIP gezeigt werden, dass es durch Stickstoff-Signale aktiviert direkt an den bZIP1-Promotor bindet und die Expression somit reguliert. *ASN1* wiederum ist ein Zielgen von bZIP1 und Asparagin eine wichtige Aminosäure für die Speicherung und den Transport von Stickstoff (Lam et al., 1994). Da die Transkription von *bZIP1* auch über Kohlenhydratvorkommen reguliert wird (Gutiérrez et al., 2007; Kang et al., 2010), wird bZIP1 bereits die Funktion als möglicher Integrator von C- und N-Assimilierung für die Regulation der Stickstoff-Assimilierung in *Arabidopsis* zugeschrieben.

In Experimenten, in denen Pflanzen einer verlängerten Nacht ausgesetzt wurden, konnten Dietrich et al. (2011) belegen, dass bZIP1 und bZIP53 eine funktionelle Redundanz in der Antwort auf Energieverarmung zeigten. In Experimenten dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *bZIP53* durch dieselben Stimuli (z.B. Salz und ABA) aktiviert wird, wie *bZIP1*, jedoch ist die Expressionsstärke von *bZIP53* geringer. Unterschiede in der Regulation von *bZIP53* konnten mit Mutanten des ABA-Signaltransduktionswegs gezeigt werden. *bZIP1* und *bZIP53* zeigen ähnliche Reaktionen auf Stimuli und auf Grund funktioneller Redundanz, werden aber unterschiedlich reguliert. In dieser Arbeit konnte der von Sun et al. (2012) gezeigte Phänotyp der *bzip1*-Mutante nicht reproduziert werden. Hier zeigte die Mutante nach Keimung auf salzhaltigem Medium keinen Unterschied zum Wildtyp. Zum einen aus diesem Grund und auf Grund der funktionellen Redundanz, wurde für eine Transkriptom- und Me-

tabolomanalyse eine *bzip1/bzip53*-Doppelmutante verwendet.

Im Wildtyp ist auffällig, dass bereits nach einer Stunde Salzstress viele Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, verstärkt exprimiert werden. Viele der Transkriptionsfaktoren sind an der Antwort auf abiotischen Stress beteiligt, wie z.B. *CBF1* und *DREB2A*, die kälteinduzierbare Gene aktivieren (Liu et al., 1998; Stockinger et al., 1997) oder ERF- und WRKY-Transkriptionsfaktoren (Yamasaki et al., 2013). Die gehäufte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nach Salzstress spricht für eine schnelle Anpassung der Pflanze an den Stress. Gene, die für Calmoduline kodieren, die mit Ca^{2+} Komplexe bilden (Lee et al., 2000; Yang and Poovaiah, 2003), werden auch nach einer Stunde Salzstress verstärkt induziert. Die Transkriptionsfaktorgene *bZIP1* und *bZIP53* zeigen erst nach längerem Salzstress (3-6 h) eine verstärkte Expression. Die Vermutung liegt hier nahe, dass die Transkription von anderen viel früher aktivierten Faktoren reguliert wird. Um eine Regulation über früher induzierte Transkriptionsfaktoren zu analysieren, müsste die Expression von *bZIP1* in *loss-of-function*-Mutanten der möglichen Regulatoren durchgeführt werden. Außerdem sollte die Promotorregion von *bZIP1* auf Bindeelemente untersucht werden. Ein weiterer Ansatz wäre ein Protoplasten-Screening im PTA-System (Wehner et al., 2011), bei dem die Aktivität des Pro:bZIP1:LUC-Reporterkonstrukts nach Zugabe der verschiedenen Transkriptionsfaktoren gemessen wird. Mögliche Interaktionen sollten dann mittels ChIP verifiziert werden.

Nach drei bzw. sechs Stunden Salzstress findet man auch immer noch Transkriptionsfaktorgene, die hochreguliert werden, bei weitem jedoch nicht so viele, wie nach der ersten Stunde. LEA-Gene, die in der Samenentwicklung wichtig sind (Alonso et al., 2009) und Gene, die an der ABA-Biosynthese bzw. -Signaltransduktion beteiligt sind, wie z.B. *HAI1*, *2* und *3* (*HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1, 2, 3*) (Fujita et al., 2009) oder *PP2CA* (*PROTEIN PHOSPHATASE 2CA*) (Schweighofer et al., 2004) werden hier verstärkt exprimiert. ABA wird bei abiotischem Stress gebildet. Hier wird deutlich, dass im Wildtyp eine Anpassung an den Stress geschieht indem die Expression stressresponsiver Gene verstärkt wird.

Für *bZIP1* und *bZIP53* konnte in der Transkriptom- und Metabolomanalyse gezeigt werden, dass sie unter Salzstress sowohl im Kohlenhydrat- als auch im Aminosäuremetabolismus eine wichtige Rolle spielen. Zunächst ist auffallend, dass es in der Transkriptomanalyse kaum eine Überschneidung der differentiell zum Wildtyp regulierten Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten gibt. Das lässt darauf schließen, dass die Reaktion auf den Salzstress in zwei Phasen abläuft. Nach drei Stunden Salzstress sieht man deutlich, dass in der Wurzel viele mit Hypoxia und Fermentation assoziierte Gene in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante weniger stark induziert wurden als im Wildtyp. Unter anderem findet man die Hypoxia-Gene *SUS4* (*SUCROSE SYNTHASE 4*), *PDC1*

(*PYRUVATE DECARBOXYLASE 1*) und *ADH1* (*ALCOHOL DEHYDROGENASE 1*) (Gibbs et al., 2011). *SUS4* ist von Pucciariello und Perata (2012) als *core hypoxic gene* beschrieben worden und kodiert für ein Saccharose degradierendes Enzym (Baroja-Fernández et al., 2012), was erklären könnte, dass nach drei bis sechs Stunden Salzstress ein Anstieg von den Monosacchariden Glukose und Fruktose zu sehen ist, was durch den Abbau von Saccharose geschehen kann, um Energie zu mobilisieren. In Versuchen in denen die Blätter von salzgestressten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen untersucht wurden, konnten Kempa et al. (2008) zeigen, dass sich die Menge vieler löslicher Zucker und auch das Verhältnis von Glukose zu Fruktose deutlich ändert, was auf eine Beeinträchtigung des Kohlenhydratstoffwechsels hinweist. Längerer Salzstress über drei bis fünf Tage führte zu einem verstärkten Stärkeabbau und somit zu einem Anstieg der Maltose-Menge. In der Microarrayanalyse im Wildtyp konnte nach Salzstress zwar eine leicht verstärkte Expression der β -Amylasegene *BAM1* und *BAM7* gezeigt werden, die Menge an Stärke im mit Salz behandelten Wurzelmaterial verändert sich jedoch nicht (siehe Anhang, Abbildungen 8.3 und 8.4). In dieser Arbeit wurden die Proben allerdings nur bis zu 24 h mit NaCl behandelt. Hier ist zu vermuten, dass in diesem Fall Zucker aus dem *sink*-Gewebe in die Wurzel transportiert wird (Ludewig and Flügge, 2013). Eine weitere Stärkemessung mit salzbehandeltem Wurzelmaterial muss hier sowohl im Wildtyp als auch in der Doppelmutante durchgeführt werden, um die Änderungen im Kohlenhydratmetabolismus nach längerem Salzstress zu beobachten. Zudem findet man unter den herunterregulierten Genen *SWEET4*, das zur Familie der Zuckertransporter gehört, über dessen genaue Funktion allerdings noch nicht mehr bekannt ist (Chen et al., 2012; Xuan et al., 2013). Ob dieser Transporter eine wichtige Rolle in der bZIP1-vermittelten Signaltransduktion nach Salzstress spielt, ist zu überprüfen. Die salzinduzierte Expression von *bZIP1 sweet4*-Mutante könnte diese zeigen.

Nach sechs Stunden Salzstress ist es auffällig, dass die Zuckermengen in der Wildtyp-Wurzel nicht weiter ansteigen. In qRT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Gene wie *FBP* und *PPDK* nach drei bzw. sechs Stunden Salzstress im Wildtyp stark induziert werden. *FBP* wird eine Funktion als Fruktose-Sensor zugeschrieben (Cho and Yoo, 2011). Ein missregulierter Kohlenhydratstoffwechsel kann somit in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante auch auf die verringerte Expression der *FBP* zurückgeführt werden. *FBP* und *PPDK* spielen eine Schlüsselrolle in der Glukoneogenese und werden hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen exprimiert (Pucciariello et al., 2012; Hsu et al., 2011). Wenn unter Stressbedingungen zu wenig Kohlenhydrate zur Verfügung stehen, werden Stoffwechselwege induziert, die andere Substrate zum Energiegewinn abbauen, wie z.B. Lipide oder Proteine (Mentzen et al., 2008; Araújo et al., 2011). Die Daten der Transkriptom-Analyse zeigen, dass nach Salzstress viele Gene, die in den Abbau von Aminosäuren involviert sind, im Wildtyp verstärkt induziert wer-

den. Aminosäuren können zu Vorstufen für die Glukoneogenese abgebaut werden und somit als alternative Energiequelle dienen. Fujiki et al. (2001a) konnten zeigen, dass in zuckerverarmten Zellen die verzweigt-kettigen Aminosäuren abgebaut werden. Auch die Daten der Metabolomanalyse sprechen dafür, dass der Abbau von Aminosäuren unter Stressbedingungen erhöht wird. Nach sechs Stunden kann z.B. für die verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin eine Abnahme beobachtet werden. Dazu passt, dass die Gene *BCAT2* und *MCCA* stark exprimiert werden. Diese Aminosäuren werden zu Acetyl-CoA abgebaut, das wiederum ein Zwischenprodukt für den Citratzyklus darstellt (Binder, 2010; Araújo et al., 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass verzweigt-kettige Aminosäuren beim Abbau Elektronen direkt für die Elektronentransport-Kette über das Elektronentransferierende Flavoprotein (ETF) bereitstellen können (Araújo et al., 2010). Eine weitere Aminosäure, die nach Salzstress abgebaut wird ist Tyrosin, auch hier konnte eine verstärkte Expression von den Abbaugen *TAT7* und *HGO* gezeigt werden (Riewe et al., 2012; Fernández-Cañón and Peñalva, 1995). Tyrosin wird zu Fumarat abgebaut und somit auch in den Citratzyklus eingeschleust (Dixon and Edwards, 2006).

In der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante zeigt sich, dass die Gene für den Aminosäure-Abbau weniger stark exprimiert werden, das spiegelt sich auch in den Aminosäure-Mengen wieder, so dass in der Mutante eine höhere Menge an Aminosäuren zu finden ist. Dazu passt, dass in dunkelinduzierten Blättern nachgewiesen wurde, dass die Zunahme an verzweigt-kettigen Aminosäuren in Pro35S:bZIP1- und Pro35S:bZIP53-Überexpressionpflanzen reduziert ist (Dietrich et al., 2011).

Der Citratzyklus in Teil vieler metabolischer Signalwege. Fast alle Aminosäuren werden zu Vorstufen von Intermediaten des Citratzyklus abgebaut (Araújo et al., 2011). Jiang and Deyholos (2006) konnten zeigen, dass die Transkriptmengen u.a. von Genen des Citratzyklus nach Salzstress im Wildtyp generell reduziert sind. Differentiell in der *bzip1/bzip53*-Mutante regulierte Gene, die eine Rolle im Citratzyklus spielen, konnten in dieser Transkriptomanalyse nicht gefunden werden, jedoch sieht man auf metabolischer Ebene Unterschiede für die zweite Hälfte des Citratzyklus (siehe Anhang, Abbildung 8.5). Die Mengen an Succinat, Fumarat und Malat sind in der Doppelmutante höher als im Wildtyp, was die Idee der metabolischen Umprogrammierung durch bZIP1 und bZIP53 unterstützt.

ASN1 ist das einzige Gen der Aminosäure-Biosynthese, das nach Salzstress in der Wurzel differentiell in *bzip1/bzip53* reguliert wird. qRT-PCR-Daten belegen, dass die Reduktion der Induktion in der *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* noch stärker ist, als in der Doppelmutante, was sonst nur noch für *PPDK* zu sehen ist. In den anderen Genen, die am Aminosäureabbau beteiligt sind, unterscheidet sich die Expression in der Doppel- und in der Quadrupelmutante kaum. Die Expression dieser Gene wird vermutlich durch

andere Heterodimerisierungspartner von bZIP1 und bZIP53 reguliert. Die Induktion von *ASN1* führt zur Biosynthese von Asparagin. Dietrich et al. (2011) konnten bereits nachweisen, dass *ASN1* im Blatt auch durch Energieverarmung nach Dunkelheit verstärkt exprimiert wird. Auf Grund seines hohen Stickstoff zu Kohlenstoff-Verhältnisses und seiner Stabilität ist Asparagin eine wichtige Aminosäure für den Stickstofftransport über lange Strecken und auch für die Stickstoffspeicherung geeignet (Lam et al., 1994). Die *PPDK* zeigt ein ähnliches Expressionsmuster in Wildtyp, Doppel- und Quadrupelmutante nach Salzstress wie *ASN1*. Zudem konnte belegt werden, dass die Expression auch in dunkelinduzierten Blättern von *Arabidopsis thaliana* und in Wurzeln von *Oryza sativa* unter Hypoxia erhöht ist (Lin and Wu, 2004; Taylor et al., 2010). Die Expression der *PPDK* in der Pro35S:AtbZIP1-Überexpressionspflanze ist erhöht. Da eine verstärkte Expression von *bZIP1* unter normalen Umständen bei Energiemangel auftritt, ist es schlüssig, dass die Transkription von *PPDK*, die eine zentrale Rolle in der Glukoneogenese spielt, in einer Pro35S:AtbZIP1-Überexpressionspflanze erhöht ist. Durch die Glukoneogenese können abgebaute Aminosäuren wieder als Energiequelle bereitgestellt werden.

Salzgestresste Wurzeln und dunkelinduzierte Blätter von *Arabidopsis thaliana* zeigen eine ähnliche Signaltransduktionsantwort, die SnRK1 und bZIP-Transkriptionsfaktoren beinhaltet, um das Gleichgewicht der Pflanze aufrecht zu erhalten (Baena-Gonzalez et al., 2007; Dietrich et al., 2011). Daher lässt sich vermuten, dass bZIP1 eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Antwort auf Stress spielt.

7.3 Stressresponsive Gene werden durch verknüpfte ABA-abhängige und ABA-unabhängige Signaltransduktionswege reguliert

Es konnte hier nachgewiesen werden, dass bZIP1 und bZIP53 unter Salzstress wichtige Komponenten für die Regulation des Zucker- und Aminosäurehaushaltes darstellen. Auch bei Energieverarmung in Blättern konnte ihnen eine regulatorische Funktion zugeschrieben werden. ChIP-Analysen in Blattmaterial konnten *ASN1* bereits als direktes Zielgen von bZIP1 identifizieren (Dietrich et al., 2011). In dieser Arbeit konnte in *Arabidopsis thaliana*-Wurzeln eine direkte Bindung von bZIP1 an den BCAT2-Promotor gezeigt werden. Das Ergebnis ist jedoch nur vorläufig und konnte bisher nicht reproduziert werden. Zudem konnte das Ergebnis nur für unbehandeltes Wurzelmaterial gezeigt werden, daher ist ein weiteres Experiment nötig. Interessant wäre auch, eine mögliche Bindung von bZIP1 an den Promotor von *PPDK* zu untersuchen. Für *PPDK* konnte in der *bzip1/bzip53*-Mutante eine verringerte Transkription festgestellt werden, in

Pro35S:AtbZIP1-Überexpressionspflanze eine verstärkte.

Die bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe S1 bilden bevorzugt Heterodimere mit bZIPs der Gruppe C (Ehlert et al., 2006; Weltmeier et al., 2006). Im Blatt konnte bereits nachgewiesen werden, dass in Quadrupelmutanten, wie *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25*, die induzierte Genexpression durch Energiemangelbedingungen reduziert wurde. Ähnliches konnte in dieser Arbeit in der Wurzel gezeigt werden. Die Expression von *PPDK* und *ASN1* ist in der Quadrupelmutante stärker reduziert, als in der Doppelmutante. Für die Gene, die im Aminosäure-Katabolismus eine Rolle spielen, wie z.B. *BCAT2*, *MCCA*, *TAT7* und *HGO*, ist jedoch die Expression von *bZIP10* und *bZIP25* nicht von regulatorischer Bedeutung. Die Expression der Gene in der Doppelmutante zeigt keine signifikanten Unterschiede zu der in der Quadrupelmutante. Hier scheinen die Transkriptionsfaktoren bZIP1 und bZIP53 mit bislang noch unbekanntem Faktoren zu heterodimerisieren um die Genexpression zu aktivieren. Die Expression der bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C selbst wird nicht durch Salz induziert, allerdings konnte ihnen hier für die Gene *PPDK*, *ASN1* und *DIN2* eine Rolle in der Antwort auf Salzstress zugewiesen werden. Zudem ist bekannt, dass die Transkriptionsfaktoren als Heterodimere mit Gruppe S1-bZIPs zu einer verstärkten Genaktivierung führen. Das spricht dafür, dass durch die Bildung spezifischer Heterodimere ein komplexes regulatorisches Netzwerk entsteht, das die transkriptionelle Umprogrammierung nach Salzstress steuert. In der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante werden nach sechs Stunden Salzstress Gene, z.B. *EARLI1*, *LEA76* und *RD29B*, die durch ABA und somit durch die Transkriptionsfaktoren der Gruppe A (AREB, ABF) aktiviert werden (Oh et al., 1996; Zimmermann et al., 2004; Nemhauser et al., 2006; Toufighi et al., 2005), herunterreguliert. Da die Induktion von *bZIP1* unabhängig vom ABA-Signatransduktionsweg ist, wurden mit den *aba2-*, *snrk2.2/2.3/2.6-* und *areb1/areb2/abf3*-Mutanten, die in der ABA-Biosynthese bzw. in der ABA-Signaltransduktion eine Rolle spielen, weitere qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Obwohl bZIP1 und bZIP53 nah verwandt sind (Jakoby et al., 2002), zeigt bZIP53 hier ein anderes Muster. Die Induktion ist von den SnRK2-Kinasen und den AREB-Transkriptionsfaktoren abhängig. Viele salzresponsive Gene, die in der Microarrayanalyse unter den differentiell regulierten Genen gefunden wurden, werden durch bZIP Transkriptionsfaktoren der Gruppe A reguliert (Yoshida et al., 2010). Das lässt vermuten, dass sowohl bZIP-Transkriptionsfaktoren des C/S1-Netzwerks, als auch bZIPs der Gruppe A die Promotoren der Zielgene aktivieren. Die in der Microarrayanalyse gefundenen salzresponsiven Gene konnten mittels qRT-PCR-Experimenten in vier Hauptklassen eingeteilt werden.

Die Klasse 1 besteht aus Genen wie *LEA76*, *AIL1*, *EARLI1* oder *RD29B*, die nicht vom C/S1-Netzwerk sondern nur von den Transkriptionsfaktoren der Gruppe A sowie den anderen Komponenten des ABA-Signaltransduktionsweges abhängig sind. Die ver-

minderte Induktion dieser Gene in der *bzip1/bzip53*-Mutante im Microarray lässt sich hier auf indirekte Effekte zurückführen.

Die Gene der Klasse 2 sind sowohl abhängig von den Transkriptionsfaktoren der Gruppe A, als auch von bZIP1 und bZIP53. Die Expression der Gene ist sowohl in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante, als auch in der *areb1/areb2/abf3*-Mutante reduziert. Zudem ist auch eine Abhängigkeit von den SnRK2-Kinasen zu sehen. Unter den Klasse 2-Genen sind z.B. *BCAT2*, als direktes Zielgen von bZIP1, sowie *MCCA*. Diese Gene werden z.B. auch im Blatt unter Energiemangelbedingungen aktiviert. Es spricht dafür, dass die Gene identisch reguliert sind, da beide Gene am Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt sind. Bei dieser Genregulation scheint sich also der ABA-SnRK2-AREB-Signalweg mit dem SnRK1-bZIP1-Signalweg zu überschneiden bzw. zu interagieren. Ob allerdings die S1- und A-bZIPs untereinander Heterodimere bilden oder mit anderen Faktoren ist noch unklar. Eine Analyse der Bindestellen im bZIP1-Promotor können darüber Aufschluss geben.

Zur Klasse 3 gehören die Gene *TAT7* und *HGO*, die beide im Tyrosin-Abbau zu Fumarat eine Rolle spielen. Nach Salzstress ist die Expression beider Gene in der *areb1/areb2/abf3*-Mutante gleich der im Wildtyp, somit ist die Transkriptionsregulation unabhängig von den Transkriptionsfaktoren der Gruppe A. Die anderen Komponenten des ABA-Biosynthese- bzw. Signaltransduktionsweges sind auch nicht an der Genexpression beteiligt. Hier ist lediglich eine Abhängigkeit von bZIP1 und bZIP53 zu sehen. Wie auch bei den Klasse 2-Genen scheint hier bei der Genaktivierung keine Heterodimerisierung mit bZIP10 und bZIP25 vorzuliegen. Wieder werden zwei Gene, die eine Funktion im Aminosäurekatabolismus haben über die gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert. Welche Heterodimerisierungspartner hier eine Rolle spielen muss noch weiter untersucht werden. Kandidaten hierfür wären unter anderem die Transkriptionsfaktoren bZIP9 und bZIP63, die den bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe C angehören, aber auch weitere noch unbekannte Faktoren können hier von Bedeutung sein.

Zur letzten Klasse 4, gehören *PPDK*, *ASN1* und *DIN2*. Diese Gene sind ebenfalls von den Gruppe A-bZIPs unabhängig. Dafür zeigen sie eine Abhängigkeit vom C/S1-Netzwerk, also sowohl von bZIP1 und bZIP53 als auch von bZIP10 und bZIP25. In der Quadrupelmutante ist die Expression deutlich geringer als in der Doppelmutante. Daraus lässt sich schließen, dass in diesem Fall eine Heterodimerisierung der Transkriptionsfaktoren der Gruppe C und der Gruppe S1 vorliegt. Interessanterweise zeigen die drei Gene auch eine Abhängigkeit von SNRK2. Das weist auf eine Regulation verschiedener übergreifender Signaltransduktionswege hin, was aber noch intensiver untersucht werden muss.

Die Regulation der Klasse 1-Gene ist eindeutig. Die anderen drei Genklassen schei-

nen einer komplexen Regulation aus SnRK1 und den C/S1-bZIPs mit dem ABA-SnRK2-AREB zu unterliegen. Außerdem konnten weitere Gene in dieser Arbeit gefunden werden, die sich nicht eindeutig einer Klasse zuordnen lassen und sowohl durch Komponenten des einen als auch des anderen Signalwegs reguliert werden. In einem Protoplasten-Two-Hybrid-Versuch konnte keine Heterodimerisierung von C/S1-bZIPs und Gruppe A-bZIPs festgestellt werden (siehe Anhang, Abbildung 8.6). Allerdings wurde der Versuch in Blattmesophyll-Protoplasten durchgeführt, wohingegen für alle anderen Versuche Wurzelmaterial verwendet wurde. In einem weiterführenden Versuch sollten Wurzelprotoplasten analysiert werden. Durch diese Ergebnisse lässt sich ableiten, dass hier der ABA-Signaltransduktionsweg, der durch abiotischen Stress aktiviert wird mit dem Signaltransduktionsweg, der durch Energieverarmung SnRK1-Kinasen und somit bZIP1 aktiviert, zusammenhängt. Die Vernetzung der unterschiedlichen Signaltransduktionswege muss genauer untersucht werden, um anfallende Fragen zu klären. Bilden C- oder S1-bZIPs in der Wurzel Heterodimere mit Gruppe A-bZIPs? Welche Transkriptionsfaktoren bilden mögliche Heterodimerisierungspartner mit bZIP1 und/oder bZIP53? Welchen Einfluss hat die Dephosphorylierung der SnRK1 durch PP2Cs (Rodrigues et al., 2013), oder die Phosphorylierung der SnRK1 durch SnRK2 (Umezawa et al., 2013) auf die Expression der regulierten Gene?

Zusammenfassend ergibt sich aus den Daten folgendes Modell:

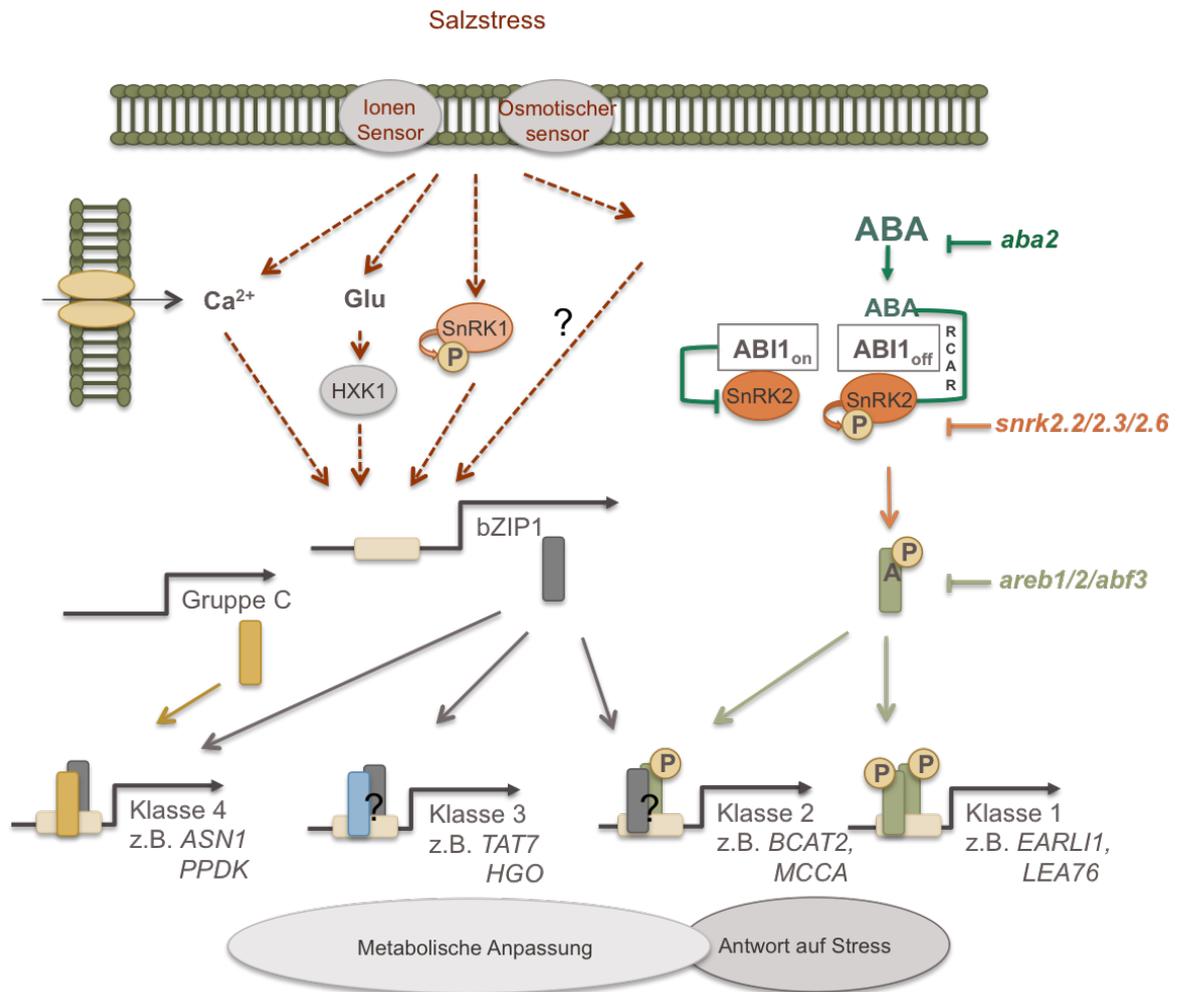


Abbildung 7.1: **Modell zur Zusammenfassung der Ergebnisse:** Dieses Modell soll einen Überblick der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse bieten. Salzstress wird über einen noch nicht bekannten Ionen- oder osmotischen Sensor wahrgenommen und löst verschiedene Antworten in der Zelle aus, die auf den *bZIP1*-Promotor wirken. Calcium-Ausstrom (Ca^{2+}), die HEXOKINASE 1 (HXK1) und die Aktivierung der SnRK1, die wahrscheinlich unabhängig voneinander wirken, aktivieren die Expression der *bZIP1*-Transkription. Auch ABA führt zu erhöhter *bZIP1*-Induktion und löst zudem den ABA-Signaltransduktionsweg über SnRK2 und AREB aus, von dem die *bZIP1*-Expression aber unabhängig ist. Die durch Stress induzierten Transkriptionsfaktoren *bZIP1* und AERBs bewirken nun die Expression von Genen, die zum einen in der Antwort auf abiotischen Stress, zum anderen an der metabolischen Anpassung der Pflanze beteiligt sind. Hierbei können die potentiellen Zielgene auf Grund ihrer unterschiedlichen Regulation in die Klassen 1 (reguliert von Gruppe A), 2 (reguliert von Gruppen A und S1), 3 (reguliert von Gruppe S1) und 4 (reguliert von Gruppen C und S1) eingeteilt werden. Für die Klassen 2 und 3 ist jedoch nicht klar, mit welchen Heterodimerisierungspartnern die Transkriptionsfaktoren die Transkription des Gens regulieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass *bZIP1* in der pflanzlichen Antwort auf Salzstress in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks ist, das zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege miteinander

verknüpft. Die durch SnRK2 und AREB vermittelte ABA-Antwort auf abiotischen Stress, konnte mit dem SnRK1-C/S1-Netzwerk, das durch den Energiestatus der Zelle reguliert wird, verknüpft werden. Die hier untersuchten stressresponsiven Gene werden durch unterschiedliche Faktoren dieser Signaltransduktionswege reguliert. Die Kombination von bZIP-Transkriptionsfaktoren verschiedener Gruppen führt somit zu unterschiedlichen Genexpressionsmustern, die wiederum bestimmte metabolische Ereignisse auslösen, was eine sehr präzise Regulation suggeriert. Das trägt dazu bei die pflanzliche Antwort auf Salzstress besser zu verstehen, womit Möglichkeiten gegeben werden, die Toleranz landwirtschaftlich genutzter Pflanzen gegenüber Salzstress zu erhöhen.

Literaturverzeichnis

- Allan, A. C. and Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9(9):1559–1572.
- Alonso, R., Oñate-Sánchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2009). A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bzip53 in the regulation of arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell*, 21(6):1747–61.
- Ananieva, E. A., Gillaspay, G. E., Ely, A., Burnette, R. N., and Erickson, F. L. (2008). Interaction of the wd40 domain of a myoinositol polyphosphate 5-phosphatase with snrk1 links inositol, sugar, and stress signaling. *Plant Physiol*, 148(4):1868–82.
- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I. A., Leaver, C. J., and Fernie, A. R. (2010). Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-coa dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of arabidopsis mitochondria. *Plant Cell*, 22(5):1549–63.
- Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., and Fernie, A. R. (2011). Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci*, 16(9):489–98.
- Azumi, Y. and Watanabe, A. (1991). Evidence for a senescence-associated gene induced by darkness. *Plant Physiol*, 95(2):577–83.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156):938–942.
- Baena-González, E. and Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, 13(9):474–82.
- Bailey-Serres, J. and Voesenek, L. A. C. J. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol*, 59:313–39.

- Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Li, J., Bahaji, A., Almagro, G., Montero, M., Etxeberria, E., Hidalgo, M., Sesma, M. T., and Pozueta-Romero, J. (2012). Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(1):321–6.
- Baud, S., Vaultier, M.-N., and Rochat, C. (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in arabidopsis. *J Exp Bot*, 55(396):397–409.
- Binder, S. (2010). Branched-chain amino acid metabolism in arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book*, 8:e0137.
- Bolton, E. T. and McCarthy, B. J. (1962). A general method for the isolation of rna complementary to dna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48:1390–7.
- Bruzzone, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A., Scarfì, S., Millo, E., De Flora, A., and Zocchi, E. (2007). Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic adp-ribose as second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(14):5759–64.
- Burnette, W. N. (1981). "western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein a. *Anal Biochem*, 112(2):195–203.
- Carden, D. E., Walker, D. J., Flowers, T. J., and Miller, A. J. (2003). Single-cell measurements of the contributions of cytosolic na(+) and k(+) to salt tolerance. *Plant Physiol*, 131(2):676–83.
- Carroll, L. J., Dunaway-Mariano, D., Smith, C. M., and Chollet, R. (1990). Determination of the catalytic pathway of c4-leaf pyruvate, orthophosphate dikinase from maize. *FEBS Lett*, 274(1-2):178–80.
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., and Frommer, W. B. (2012). Sucrose efflux mediated by sweet proteins as a key step for phloem transport. *Science*, 335(6065):207–11.
- Cho, Y.-H., Sheen, J., and Yoo, S.-D. (2010). Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and c2h4 responses in arabidopsis. *Plant Physiol*, 152(3):1180–2.
- Cho, Y.-H. and Yoo, S.-D. (2011). Signaling role of fructose mediated by *fins1/fbp* in arabidopsis thaliana. *PLoS Genet*, 7(1):e1001263.

- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D., and Sheen, J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127(3):579–89.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S. Y. (2000). Abfs, a family of abarresponsive element binding factors. *J Biol Chem*, 275(3):1723–30.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of rna, dna and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3):532–4, 536–7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–9.
- Christmann, A., Grill, E., and Huang, J. (2013). Hydraulic signals in long-distance signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 16(3):293–300.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S. J., Muttucumar, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M. A. J., and Halford, N. G. (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of snf1-related protein kinase (snrk) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent snrk2. *J Exp Bot*, 63(2):913–24.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., and Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, 61:651–79.
- Davenport, R., James, R. A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M., and Munns, R. (2005). Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol*, 137(3):807–18.
- Diebold, R., Schuster, J., Däschner, K., and Binder, S. (2002). The branched-chain amino acid transaminase gene family in arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiol*, 129(2):540–50.
- Dietrich, K., Weltmeier, F., Ehlert, A., Weiste, C., Stahl, M., Harter, K., and Dröge-Laser, W. (2011). Heterodimers of the arabidopsis transcription factors bzip1 and bzip53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell*, 23(1):381–95.
- Dixon, D. P. and Edwards, R. (2006). Enzymes of tyrosine catabolism in arabidopsis thaliana. *Plant Sci*, 171(3):360–6.
- Dodd, A. N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 61:593–620.
- Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C. S., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2006). Two-hybrid protein-protein interaction analysis in

- arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group c and group s bzip transcription factors. *Plant J*, 46(5):890–900.
- Fernández-Cañón, J. M. and Peñalva, M. A. (1995). Molecular characterization of a gene encoding a homogentisate dioxygenase from *aspergillus nidulans* and identification of its human and plant homologues. *J Biol Chem*, 270(36):21199–205.
- Finkelstein, R. R. and Lynch, T. J. (2000). The arabidopsis abscisic acid response gene *abi5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12(4):599–609.
- Flowers, T. J., Troke, P. F., and Yeo, A. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol*, (28):89–121.
- Ford, C. W. (1984). Accumulation of low molecular weight solutes in water-stressed tropical legumes. *Phytochemistry*, 23(5):1007–1015.
- Foster, R., Izawa, T., and Chua, N. H. (1994). Plant bzip proteins gather at acgt elements. *FASEB J*, 8(2):192–200.
- Foyer, C. H. and Noctor, G. (2013). Redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal*, 18(16):2087–90.
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L., and Zhu, J.-K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 462(7273):660–4.
- Fujii, H. and Zhu, J.-K. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(20):8380–5.
- Fujiki, Y., Ito, M., Nishida, I., and Watanabe, A. (2001a). Leucine and its keto acid enhance the coordinated expression of genes for branched-chain amino acid catabolism in arabidopsis under sugar starvation. *FEBS Lett*, 499(1-2):161–5.
- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I., and Watanabe, A. (2001b). Dark-inducible genes from arabidopsis thaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol Plant*, 111(3):345–352.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three *snrk2* protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 50(12):2123–32.

- Geigenberger, P. (2003). Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr Opin Plant Biol*, 6(3):247–56.
- 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):415–8.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., and Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative rt-pcr. *Genome Res*, 6(10):995–1001.
- Goyer, A., Collakova, E., Shachar-Hill, Y., and Hanson, A. D. (2007). Functional characterization of a methionine gamma-lyase in arabidopsis and its implication in an alternative to the reverse trans-sulfuration pathway. *Plant Cell Physiol*, 48(2):232–42.
- Greenway, H. and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, (31):149–190.
- Guiltinan, M. J., Marcotte, Jr, W. R., and Quatrano, R. S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*, 250(4978):267–71.
- Guo, J., Zeng, Q., Emami, M., Ellis, B. E., and Chen, J.-G. (2008). The gcr2 gene family is not required for aba control of seed germination and early seedling development in arabidopsis. *PLoS One*, 3(8):e2982.
- Gupta, K. J., Zabalza, A., and van Dongen, J. T. (2009). Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiol Plant*, 137(4):383–91.
- Gutiérrez, R. A., Lejay, L. V., Dean, A., Chiaromonte, F., Shasha, D. E., and Coruzzi, G. M. (2007). Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in arabidopsis. *Genome Biol*, 8(1):R7.
- Gutiérrez, R. A., Stokes, T. L., Thum, K., Xu, X., Obertello, M., Katari, M. S., Tanurdzic, M., Dean, A., Nero, D. C., McClung, C. R., and Coruzzi, G. M. (2008). Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene *cca1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(12):4939–44.
- Halford, N. G., Hey, S., Jhurrea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M., and Zhang, Y. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of snf1-related (snrk1) protein kinase. *J Exp Bot*, 54(382):467–75.

- Halford, N. G. and Hey, S. J. (2009). Snf1-related protein kinases (snrks) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J*, 419(2):247–59.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M. M. W. B., and Smeekens, S. (2008). The sucrose regulated transcription factor bzip11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of asparagine synthetase1 and proline dehydrogenase2. *Plant J*, 53(6):935–49.
- Hanson, J. and Smeekens, S. (2009). Sugar perception and signaling—an update. *Curr Opin Plant Biol*, 12(5):562–7.
- Hardie, D. G. (2011). Amp-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25(18):1895–908.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., and Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51:463–499.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., and Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor sir3 from telomeric heterochromatin. *Nature*, 383(6595):92–6.
- Heinekamp, T., Kuhlmann, M., Lenk, A., Strathmann, A., and Dröge-Laser, W. (2002). The tobacco bzip transcription factor bzi-1 binds to g-box elements in the promoters of phenylpropanoid pathway genes in vitro, but it is not involved in their regulation in vivo. *Mol Genet Genomics*, 267(1):16–26.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., and Verma, D. P. (2000). Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol*, 122(4):1129–36.
- Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussman, M. R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.-K., and Harmon, A. C. (2003). The arabidopsis cdpk-snrk superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 132(2):666–80.
- Hsu, F.-C., Chou, M.-Y., Peng, H.-P., Chou, S.-J., and Shih, M.-C. (2011). Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in arabidopsis. *PLoS One*, 6(12):e28888.

- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1):23–28.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kaku-bari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 27(4):325–33.
- Izawa, T., Foster, R., and Chua, N. H. (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol*, 230(4):1131–44.
- Jacoby, R. P., Taylor, N. L., and Millar, A. H. (2011). The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends Plant Sci*, 16(11):614–23.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F., and bZIP Research Group (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 7(3):106–11.
- Jang, J. C., León, P., Zhou, L., and Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9(1):5–19.
- Jiang, F. and Hartung, W. (2008). Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot*, 59(1):37–43.
- Jiang, Y. and Deyholos, M. K. (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biol*, 6:25.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A. R., and Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, 126(4):1358–69.
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P., and Arias, J. (2001). In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J*, 28(2):237–43.
- Jossier, M., Bouly, J.-P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., and Thomas, M. (2009). SnrK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 59(2):316–28.
- Kang, S. G., Price, J., Lin, P.-C., Hong, J. C., and Jang, J.-C. (2010). The *Arabidopsis* bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Molecular plant*, 3(2):361–73.

- Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M. R., Fluhr, R., and Fromm, H. (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic ca^{2+} transients reveal abre-related sequences as ca^{2+} -responsive cis elements in arabidopsis. *Plant Cell*, 18(10):2733–48.
- Karakas, B., Ozias-Akins, P., Stushnoff, C., Suefferheld, M., and Rieger, M. (1997). Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ*, (20):609–616.
- Kempa, S., Krasensky, J., Dal Santo, S., Kopka, J., and Jonak, C. (2008). A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS One*, 3(12):e3935.
- Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., and Knight, M. R. (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the arabidopsis root. *Plant J*, 23(2):267–78.
- Klingler, J. P., Batelli, G., and Zhu, J.-K. (2010). Aba receptors: the start of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot*, 61(12):3199–210.
- Krasensky, J. and Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot*, 63(4):1593–608.
- Kronzucker, H. J. and Britto, D. T. (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytol*, 189(1):54–81.
- Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*, 22(3):541–63.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10(3-4):203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–5.
- Lam, H. M., Peng, S. S., and Coruzzi, G. M. (1994). Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*, 106(4):1347–57.
- Laohavisit, A., Richards, S. L., Shabala, L., Chen, C., Colaço, R. D. D. R., Swarbreck, S. M., Shaw, E., Dark, A., Shabala, S., Shang, Z., and Davies, J. M. (2013). Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in arabidopsis require the calcium regulatory protein annexin1. *Plant Physiol*, 163(1):253–62.

- Lee, K.-W., Chen, P.-W., Lu, C.-A., Chen, S., Ho, T.-H. D., and Yu, S.-M. (2009). Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. *Sci Signal*, 2(91):ra61.
- Lee, S. H., Johnson, J. D., Walsh, M. P., Van Lierop, J. E., Sutherland, C., Xu, A., Snedden, W. A., Kosk-Kosicka, D., Fromm, H., Narayanan, N., and Cho, M. J. (2000). Differential regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca^{2+} concentration. *Biochem J*, 350 Pt 1:299–306.
- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2006). Functional analysis of arabidopsis *nced6* and *nced9* genes indicates that abscisic acid synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant J*, 45(3):309–19.
- Leung, J. and Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49:199–222.
- Liepman, A. H. and Olsen, L. J. (2003). Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of arabidopsis. *Plant Physiol*, 131(1):215–27.
- Lin, J.-F. and Wu, S.-H. (2004). Molecular events in senescing arabidopsis leaves. *Plant J*, 39(4):612–28.
- Liu, F., Vantoai, T., Moy, L. P., Bock, G., Linford, L. D., and Quackenbush, J. (2005). Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in arabidopsis. *Plant Physiol*, 137(3):1115–29.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S., and Zhu, J. K. (2000). The arabidopsis *thaliana sos2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7):3730–4.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, *dreb1* and *dreb2*, with an *erebp/ap2* dna binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in arabidopsis. *Plant Cell*, 10(8):1391–406.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., and Ma, L. (2007). A g protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*, 315(5819):1712–6.

- 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*. *Int J Mol Sci*, 14(5):9979–98.
- Locy, R. D., Chang, C. C., Nielsen, B. L., and Singh, N. K. (1996). Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants. *Plant Physiol*, 110(1):321–328.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., and Chua, N. H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the *abi5* transcription factor in *arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4782–7.
- Ludewig, F. and Flüggge, U.-I. (2013). Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front Plant Sci*, 4:231.
- Lumba, S., Cutler, S., and McCourt, P. (2010). Plant nuclear hormone receptors: a role for small molecules in protein-protein interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26:445–69.
- Lunn, J. E., Ashton, A. R., Hatch, M. D., and Heldt, H. W. (2000). Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23):12914–9.
- Lutfiyya, L. L., Xu, N., D'Ordine, R. L., Morrell, J. A., Miller, P. W., and Duff, S. M. G. (2007). Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *J Plant Physiol*, 164(7):923–33.
- Lynch, J., Polito, V. S., and Läuchli, A. (1989). Salinity stress increases cytoplasmic *ca* activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol*, 90(4):1271–4.
- 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):1064–8.
- Mentzen, W. I., Peng, J., Ransom, N., Nikolau, B. J., and Wurtele, E. S. (2008). Articulation of three core metabolic processes in *arabidopsis*: fatty acid biosynthesis, leucine catabolism and starch metabolism. *BMC Plant Biol*, 8:76.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., and Volokita, M. (2002). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radic Res*, 36(2):195–202.

- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., and Volokita, M. (2004). Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *lycopersicon pennellii*. *J Exp Bot*, 55(399):1105–13.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T., and Sheen, J. (2003). Role of the arabidopsis glucose sensor *hvk1* in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300(5617):332–6.
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J. M., and Awada, T. (2011). Characterization of abiotic stress-responsive arabidopsis thaliana *rd29a* and *rd29b* genes and evaluation of transgenes. *Planta*, 234(1):97–107.
- Müller, A. H. and Hansson, M. (2009). The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor. *Plant Physiol*, 150(1):157–66.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, 25(2):239–250.
- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol*, 59:651–81.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3):473–497.
- 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):1484–500.
- Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O. E., Steinhauser, D., Gibon, Y., Morcuende, R., Weicht, D., Meyer, S., and Stitt, M. (2005). Extension of the Visualization Tool MapMan to Allow Statistical Analysis of Arrays, Display of Corresponding Genes, and Comparison with Known Responses 1. *Plant Physiology*, 138(July):1195–1204.
- Nemhauser, J. L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell*, 126(3):467–75.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.-Y., Wang, A., Carvalho, P. C., Lee, S., Caddell, D. F., Cutler, S. R., Chory, J., Yates, J. R., and Schroeder, J. I. (2010). *Pyr/pyl/rcar* family members are major in-vivo *abi1* protein phosphatase 2c-interacting proteins in arabidopsis. *Plant J*, 61(2):290–9.

- North, H. M., De Almeida, A., Boutin, J.-P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., and Marion-Poll, A. (2007). The arabidopsis aba-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced aba accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J*, 50(5):810–24.
- Oh, S. A., Lee, S. Y., Chung, I. K., Lee, C. H., and Nam, H. G. (1996). A senescence-associated gene of arabidopsis thaliana is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol Biol*, 30(4):739–54.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S. P. (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J Exp Bot*, 64(2):445–58.
- 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):1068–71.
- Polge, C. and Thomas, M. (2007). Snf1/ampk/snrk1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*, 12(1):20–8.
- Price, J., Laxmi, A., St Martin, S. K., and Jang, J.-C. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in arabidopsis. *Plant Cell*, 16(8):2128–50.
- Pucciariello, C., Parlanti, S., Banti, V., Novi, G., and Perata, P. (2012). Reactive oxygen species-driven transcription in arabidopsis under oxygen deprivation. *Plant Physiol*, 159(1):184–96.
- Pucciariello, C. and Perata, P. (2012). How plants sense low oxygen. *Plant Signal Behav*, 7(7):813–6.
- Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L., and Weber, H. (2006). Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol*, 140(1):263–78.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., and Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends Plant Sci*, 15(7):395–401.
- Razem, F. A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R., and Hill, R. D. (2006). The rna-binding protein *fca* is an abscisic acid receptor. *Nature*, 439(7074):290–4.

- Riewe, D., Koochi, M., Lisec, J., Pfeiffer, M., Lippmann, R., Schmeichel, J., Willmitzer, L., and Altmann, T. (2012). A tyrosine aminotransferase involved in tocopherol synthesis in arabidopsis. *Plant J*, 71(5):850–9.
- Risk, J. M., Macknight, R. C., and Day, C. L. (2008). Fca does not bind abscisic acid. *Nature*, 456(7223):E5–6.
- 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):1501–13.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumberras, V., González-Guzmán, M., Antoni, R., Rodriguez, P. L., and Baena-González, E. (2013). Abi1 and pp2ca phosphatases are negative regulators of snf1-related protein kinase1 signaling in arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10):3871–84.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57:675–709.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Number Bd. 1 in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders, Brownlee, and Harper (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11(4):691–706.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Márquez, J. A., Cutler, S. R., and Rodriguez, P. L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor pyl5 through inhibition of clade a pp2cs. *Plant J*, 60(4):575–88.
- Sauer, N. and Stolz, J. (1994). Suc1 and suc2: two sucrose transporters from arabidopsis thaliana; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *Plant J*, 6(1):67–77.
- Schindler, U., Beckmann, H., and Cashmore, A. R. (1992). Tga1 and g-box binding factors: two distinct classes of arabidopsis leucine zipper proteins compete for the g-box-like element tgactgg. *Plant Cell*, 4(10):1309–19.
- Schulz-Lessdorf, B. and Hedrich, R. (1995). Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment—channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta*, 49:655–671.

- Schwachtje, J., Minchin, P. E. H., Jahnke, S., van Dongen, J. T., Schittko, U., and Baldwin, I. T. (2006). Snf1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(34):12935–40.
- Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I. (2004). Plant pp2c phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*, 9(5):236–43.
- Sheen, J., Zhou, L., and Jang, J. C. (1999). Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 2(5):410–8.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., and Zhu, J. K. (2000). The arabidopsis thaliana salt tolerance gene *sos1* encodes a putative na^+/h^+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12):6896–901.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, 3(3):217–23.
- Sib eril, Y., Doireau, P., and Gantet, P. (2001). Plant bzip g-box binding factors. modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem*, 268(22):5655–66.
- Smeekeens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51:49–81.
- Solomon, M. J., Larsen, P. L., and Varshavsky, A. (1988). Mapping protein-dna interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone h4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*, 53(6):937–47.
- Solomon, M. J. and Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated dna-protein cross-linking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(19):6470–4.
- Soon, F.-F., Ng, L.-M., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Tan, M. H. E., Suino-Powell, K. M., He, Y., Xu, Y., Chalmers, M. J., Brunzelle, J. S., Zhang, H., Yang, H., Jiang, H., Li, J., Yong, E.-L., Cutler, S., Zhu, J.-K., Griffin, P. R., Melcher, K., and Xu, H. E. (2012). Molecular mimicry regulates aba signaling by *snrk2* kinases and pp2c phosphatases. *Science*, 335(6064):85–8.
- Sprenger-Haussels, M. and Weisshaar, B. (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bzip transcription factors. *Plant J*, 22(1):1–8.
- Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., and Thomashow, M. F. (1997). Arabidopsis thaliana *cbf1* encodes an ap2 domain-containing transcriptional activator that binds to the

- c-repeat/dre, a cis-acting dna regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(3):1035–40.
- Sun, X., Li, Y., Cai, H., Bai, X., Ji, W., Ding, X., and Zhu, Y. (2012). The arabidopsis atbzip1 transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses. *J Plant Res*, 125(3):429–38.
- Szostkiewicz, I., Richter, K., Kepka, M., Demmel, S., Ma, Y., Korte, A., Assaad, F. F., Christmann, A., and Grill, E. (2010). Closely related receptor complexes differ in their aba selectivity and sensitivity. *Plant J*, 61(1):25–35.
- Taylor, L., Nunes-Nesi, A., Parsley, K., Leiss, A., Leach, G., Coates, S., Wingler, A., Fernie, A. R., and Hibberd, J. M. (2010). Cytosolic pyruvate,orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *Plant J*, 62(4):641–52.
- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:571–599.
- Toufighi, K., Brady, S. M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N. J. (2005). The botany array resource: e-northern, expression angling, and promoter analyses. *Plant J*, 43(1):153–63.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24:145–9.
- Tracy, F. E., Gilliam, M., Dodd, A. N., Webb, A. A. R., and Tester, M. (2008). Nacl-induced changes in cytosolic free ca²⁺ in arabidopsis thaliana are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ*, 31(8):1063–73.
- Tran, L.-S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of ahk1/athk1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51):20623–8.
- Tsai, A. Y.-L. and Gazzarrini, S. (2012). Akin10 and fusca3 interact to control lateral organ development and phase transitions in arabidopsis. *Plant J*, 69(5):809–21.
- Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., and Bramley, H. (2002). Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ*, 25(2):173–194.

- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr Opin Biotechnol*, 17(2):113–22.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J. C., Ishihama, Y., Peck, S. C., and Shinozaki, K. (2013). Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal*, 6(270):rs8.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21):11632–7.
- Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., and Stitt, M. (2008). Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in *Arabidopsis* rosettes. *Plant Physiol*, 146(4):1834–61.
- van Dongen, J. T., Roeb, G. W., Dautzenberg, M., Froehlich, A., Vigeolas, H., Minchin, P. E. H., and Geigenberger, P. (2004). Phloem import and storage metabolism are highly coordinated by the low oxygen concentrations within developing wheat seeds. *Plant Physiol*, 135(3):1809–21.
- van Dongen, J. T., Schurr, U., Pfister, M., and Geigenberger, P. (2003). Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol*, 131(4):1529–43.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*, 45(4):523–39.
- Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Bottner, S., Onate-Sanchez, L., and Droge-Laser, W. (2011). High-throughput protoplast transactivation (pta) system for the analysis of *Arabidopsis* transcription factor function. *Plant J*, 68(3):560–569.
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C. S., Dietrich, K., Wang, X., Schütze, K., Alonso, R., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2006). Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bzip transcription factors. *EMBO J*, 25(13):3133–43.
- Weltmeier, F., Rahmani, F., Ehlert, A., Dietrich, K., Schütze, K., Wang, X., Chaban, C., Hanson, J., Teige, M., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., Smeekens, S., and

- Dröge-Laser, W. (2009). Expression patterns within the arabidopsis c/s1 bzip transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol*, 69(1-2):107–19.
- Wilkosz, R. and Schläppi, M. (2000). A gene expression screen identifies earli1 as a novel vernalization-responsive gene in arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, 44(6):777–87.
- Wohlbach, D. J., Quirino, B. F., and Sussman, M. R. (2008). Analysis of the arabidopsis histidine kinase atk1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell*, 20(4):1101–17.
- Xuan, Y. H., Hu, Y. B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D. C., Hou, B.-H., and Frommer, W. B. (2013). Functional role of oligomerization for bacterial and plant sweet sugar transporter family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(39):E3685–94.
- Yakir, E., Hilman, D., Hassidim, M., and Green, R. M. (2007). Circadian clock associated1 transcript stability and the entrainment of the circadian clock in arabidopsis. *Plant Physiol*, 145(3):925–32.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 236(2-3):331–40.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. (2013). Dna-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends Plant Sci*, 18(5):267–76.
- Yang, T. and Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci*, 8(10):505–12.
- Yeo, A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49(323):915–929.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Areb1, areb2, and abf3 are master transcription factors that cooperatively regulate abe-dependent aba signaling involved in drought stress tolerance and require aba for full activation. *Plant J*, 61(4):672–85.
- Zabalza, A., van Dongen, J. T., Froehlich, A., Oliver, S. N., Faix, B., Gupta, K. J., Schmäzlin, E., Igal, M., Orcaray, L., Royuela, M., and Geigenberger, P. (2009). Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol*, 149(2):1087–98.

- Zhang, D.-P., Wu, Z.-Y., Li, X.-Y., and Zhao, Z.-X. (2002). Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. *Plant Physiol*, 128(2):714–25.
- Zhifang, G. and Loescher, W. (2003). Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant Cell Environ*, (26):275–283.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2):66–71.
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53:247–73.
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6(5):441–5.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). Genevestigator. *arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136(1):2621–32.

8 Anhang

8.1 Zuckermessung in der *gin2*-Mutante

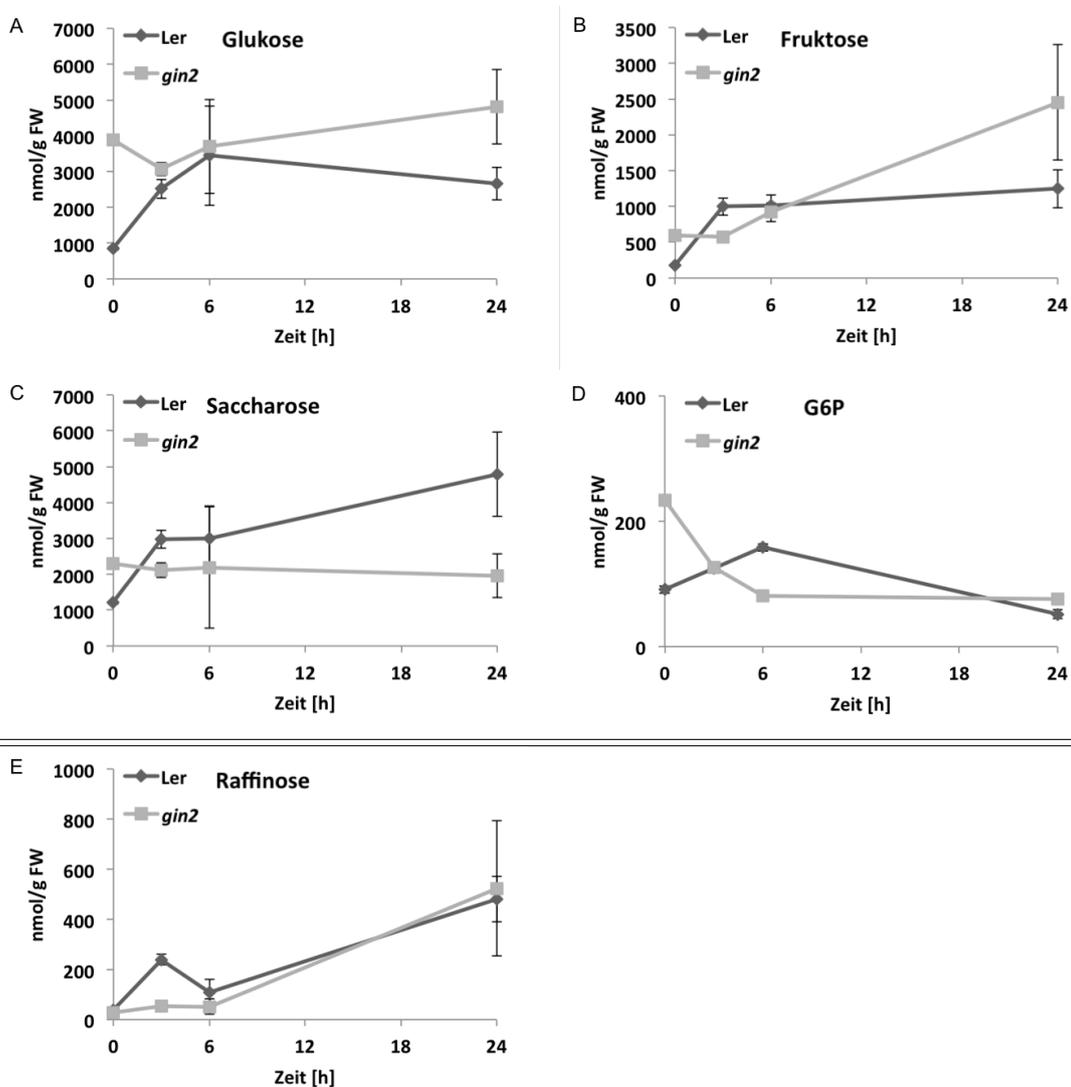


Abbildung 8.1: Menge verschiedener Zucker in der Wildtyp- und *gin2*-Wurzel nach Salzstress: Wildtyp (*Ler*) und *gin2* wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 24 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0h) geerntet. Mit Hilfe von HPLC wurde die Menge der verschiedenen Zucker gemessen (Markus Krischke, Universität Würzburg). Dargestellt ist die Menge der Zucker in nmol/g FW. (n=3, Fehler: SD)

8.2 Wurzellänge in Mutanten des C/S1-Netzwerks nach Salzstress



Abbildung 8.2: **Wurzellänge nach Salzstress:** Eine Woche alte Keimlinge, die auf MS-Medium angezogen wurden, werden auf MS-Medium transferiert, das 125 mM NaCl enthält. Nach einer weiteren Woche wird die Wurzellänge bestimmt.

8.3 Stärkemessung im Wildtyp nach Salzstress

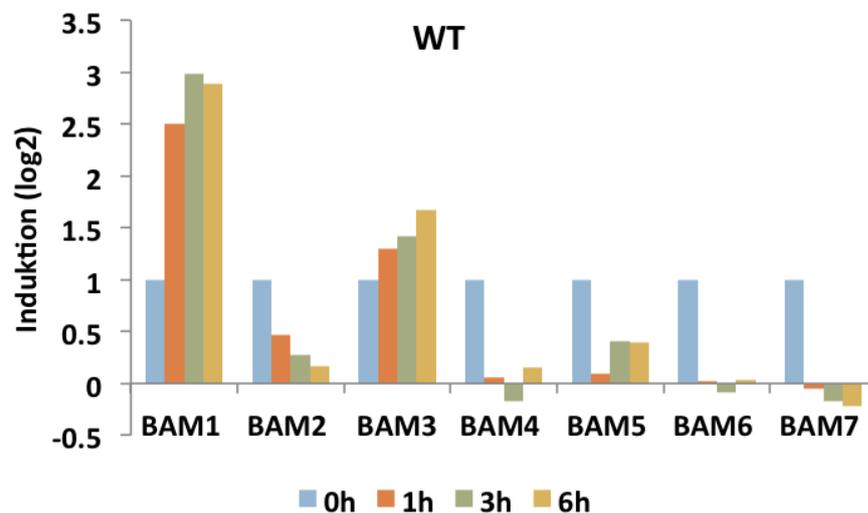


Abbildung 8.3: **Induktion der β -Amylasen in der Wildtyp-Wurzel nach Salzstress:** Die Abbildung zeigt die Induktion (\log_2) der Gene verschiedener β -Amylasen (*BAM1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6* und *7*) nach verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 6 h) Salzstress in der Wildtyp-Wurzel. Das Material wurde zum selben Zeitpunkt geerntet und mittels Microarray ausgewertet.

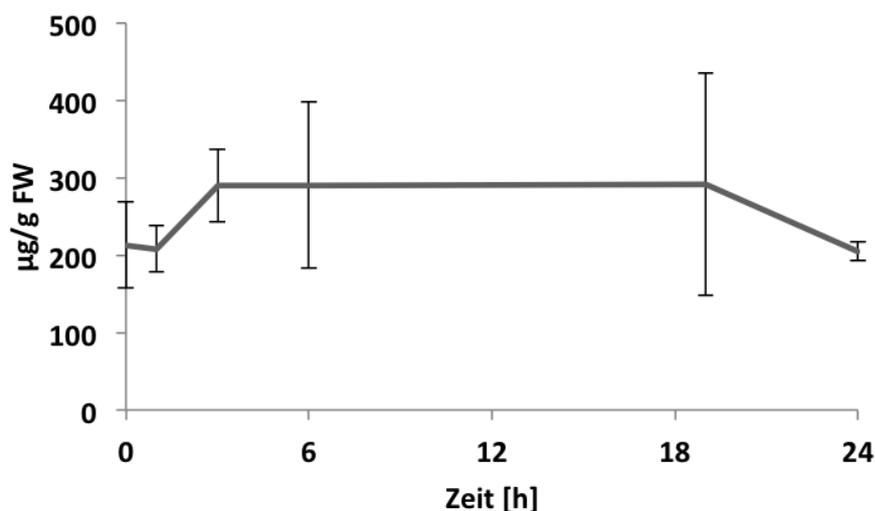


Abbildung 8.4: **Stärkemessung in der Wurzel nach Salzstress:** Wildtyppflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen, dann unterschiedlich lange (1 h, 3 h, 6 h, 19 h, 24 h) mit 150 mM NaCl behandelt und die Wurzeln zum selben Zeitpunkt (0 h) geerntet. Dann wurde die Stärke extrahiert und gemessen. Dargestellt ist die Menge in μg pro Gramm Frischgewicht ($n=3$; Fehler: SE). Die Messung wurde von Lorenzo Pedrotti durchgeführt

8.4 Daten der Microarrayanalyse des Wildtyps nach Salzstress

Tabelle 8.1: **Gene, die im WT nach 1 h Salzstress hochreguliert sind:** Die Tabelle zeigt die Gene, die in der Microarray Analyse nach 1 h Salzstress am stärksten ($> \log_2(3)$) induziert waren.

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	P-Wert
AT3G22830	AT-HSFA6B	5.82	6E-14
AT1G56600	AtGolS2	4.87	3E-16
AT5G20230	ATBCB	4.80	4E-06
AT2G44840	ERF13	4.56	3E-04
AT4G34410	RRTF1 1	4.49	2E-03
AT4G37710	VQ motif-containing protein	4.43	1E-07
AT5G13220	JAZ10	4.37	1E-06
AT1G74930	ORA47	4.37	4E-04
AT4G28140	AP2 domain-containing transcription factor, putative	4.06	1E-14

AT2G26150	ATHSFA2	4.06	4E-09
AT5G42380	CML37	4.00	1E-03
AT3G50930	BCS1	3.98	2E-04
AT4G25490	CBF1	3.97	3E-05
AT1G32970	subtilase family protein	3.88	9E-06
AT1G01720	ATAF1	3.72	1E-07
AT5G51990	CBF4	3.71	1E-08
AT5G52760	heavy-metal-associated domain-containing protein	3.68	8E-05
AT3G01830	calmodulin-related protein, putative	3.65	4E-03
AT1G17380	JAZ5	3.59	2E-04
AT1G19210	AP2 domain-containing transcription factor, putative	3.59	6E-03
AT5G64870	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	3.58	7E-04
AT1G12610	DDF1	3.58	3E-03
AT1G64160	disease resistance-responsive family protein	3.57	6E-06
AT5G05410	DREB2A; DNA binding / transcription activator	3.57	9E-07
AT3G28600	ATP binding / ATPase/ nucleotide-binding	3.55	6E-08
AT1G80840	WRKY40	3.53	3E-03
AT3G44860	FAMT;	3.52	2E-05
AT2G29450	ATGSTU5	3.52	3E-07
AT3G02840	immediate-early fungal elicitor family protein	3.52	5E-03
AT1G61340	F-box family protein	3.48	2E-04
AT2G26380	disease resistance protein-related / LRR protein-related	3.45	1E-06
AT3G23250	MYB15	3.44	2E-03
AT5G63130	PB1 domain-containing protein	3.43	3E-07
AT1G76640	calmodulin-related protein, putative	3.41	2E-04
AT5G22530	unknown protein	3.40	9E-06
AT5G19110	extracellular dermal glycoprotein-related / EDGP-related	3.38	6E-07
AT3G25760	AOC1 ALLENE OXIDE CYCLASE 1	3.37	3E-05
AT4G27657	unknown protein	3.36	3E-04
AT4G31800	WRKY18; transcription factor	3.34	1E-05
AT1G09950	transcription factor-related	3.34	2E-04
AT5G57560	TCH4	3.34	6E-04
AT4G24380	unknown protein	3.34	3E-04
AT1G28480	GRX480	3.26	2E-03
AT3G17690	ATCNGC19	3.23	6E-06
AT2G01300	unknown protein	3.23	2E-05
AT5G43620	S-locus protein-related	3.22	2E-04
AT4G29780	unknown protein	3.17	4E-03
AT1G52890	ANAC019	3.16	3E-06

AT2G41100	TCH3 (TOUCH 3); calcium ion binding	3.16	3E-05
AT1G78070	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	3.16	2E-09
AT5G59490	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	3.15	6E-05
AT1G77450	anac032	3.13	2E-09
AT2G47190	MYB2	3.13	3E-06
AT2G24850	TAT3	3.13	1E-04
AT5G47220	ERF2	3.12	8E-05
AT2G46400	WRKY46; transcription factor	3.10	1E-03
AT1G72520	lipoxygenase, putative	3.10	8E-04
AT1G80820	CCR2	3.09	2E-07
AT4G25480	DREB1A	3.07	2E-10
AT5G52750	heavy-metal-associated domain-containing protein	3.05	4E-04
AT2G26530	AR781	3.04	1E-03
AT2G02000	GAD3	3.02	2E-06
AT4G25470	CBF2	3.01	1E-03

Tabelle 8.2: **Gene, die im WT nach 3 h Salzstress hochreguliert sind:** Die Tabelle zeigt die Gene, die in der Microarray Analyse nach 3 h Salzstress am stärksten ($> \log_2(3)$) induziert waren.

AT-Nummer	Name	Induktion (log ₂)	P-Wert
AT1G56600	AtGolS2	6.92	3E-19
AT3G22830	AT-HSFA6B	6.85	3E-15
AT2G26150	ATHSFA2; DNA binding / transcription factor	6.03	4E-12
AT5G20230	ATBCB	5.93	2E-07
AT2G29450	ATGSTU5	5.93	6E-11
AT2G41730	unknown protein	5.88	1E-17
AT4G37710	VQ motif-containing protein	5.79	2E-09
AT5G13220	JAZ10	5.67	2E-08
AT5G51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	5.62	1E-11
AT3G02480	ABA-responsive protein-related	5.47	4E-13
AT5G11110	ATSPS2F	5.29	9E-16
AT1G32970	subtilase family protein	5.27	1E-07
AT2G44840	ERF13	5.23	6E-05
AT2G23170	GH3.3; indole-3-acetic acid amido synthetase	5.23	3E-17
AT3G53600	zinc finger (C2H2 type) family protein	5.21	3E-09
AT4G37370	CYP81D8	5.20	7E-14
AT1G07430	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative	5.16	2E-14
AT3G44860	FAMT	5.13	9E-08
AT5G19110	extracellular dermal glycoprotein-related / EDGP-related	5.06	9E-10

AT3G15670	LEA76	5.06	6E-13
AT2G24850	TAT3	5.05	3E-07
AT1G64160	disease resistance-responsive family protein	5.05	4E-08
AT2G15780	glycine-rich protein	5.03	2E-13
AT5G28510	BGLU24	5.03	3E-10
AT2G29460	ATGSTU4	4.82	7E-11
AT3G50930	BCS1	4.80	3E-05
AT4G28140	AP2 domain-containing transcription factor, putative	4.80	5E-16
AT1G70130	lectin protein kinase, putative	4.80	3E-07
AT4G15100	scpl30	4.75	8E-10
AT5G42380	CML37	4.71	2E-04
AT4G34410	RRTF1	4.71	1E-03
AT3G63060	EDL3	4.60	4E-14
AT3G12510	unknown protein	4.57	8E-19
AT2G26380	disease resistance protein-related / LRR protein-related	4.57	2E-08
AT1G52890	ANAC019	4.56	1E-08
AT3G06490	MYB108	4.53	2E-09
AT5G06760	lea abundant group 1 domain-containing protein	4.50	7E-10
AT2G47770	benzodiazepine receptor-related	4.50	6E-13
AT1G59860	17.6 kDa class I heat shock protein	4.46	2E-06
AT1G17380	JAZ5	4.41	2E-05
AT1G01720	ATAF1	4.41	8E-09
AT3G25760	AOC1	4.39	9E-07
AT4G25490	CBF1	4.39	8E-06
AT3G14440	NCED3	4.37	7E-11
AT3G28600	ATP binding / ATPase	4.33	2E-09
AT1G74930	ORA47	4.32	5E-04
AT1G77450	anac032	4.31	9E-12
AT1G71000	heat shock protein binding	4.28	3E-10
AT3G17110	pseudogene, glycine-rich protein	4.27	2E-10
AT3G17690	ATCNGC19	4.25	1E-07
AT5G52400	CYP715A1	4.24	7E-08
AT4G34300	glycine-rich protein	4.22	1E-12
AT1G22810	AP2 domain-containing transcription factor, putative	4.22	4E-08
AT5G59220	protein phosphatase 2C, putative	4.17	1E-11
AT2G02000	GAD3	4.14	1E-08
AT1G80840	WRKY40	4.13	6E-04
AT1G78070	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	4.13	1E-11
AT3G49620	DIN11	4.12	6E-09

AT3G25250	AGC2-1	4.10	6E-06
AT5G48850	ATSDI1	4.09	4E-13
AT3G61400	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	4.09	2E-09
AT2G03760	ST; brassinosteroid sulfotransferase/ sulfotransferase	4.09	7E-17
AT2G29440	ATGSTU6	4.09	3E-11
AT2G38240	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	4.09	7E-08
AT5G52310	LTI78	4.08	1E-12
AT5G64870	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	4.08	2E-04
AT5G52050	MATE efflux protein-related	4.07	9E-05
AT1G09930	ATOPT2	4.05	6E-12
AT5G17460	unknown protein	4.02	1E-15
AT3G28210	PMZ	4.00	2E-07
AT3G23250	MYB15	3.91	7E-04
AT1G61340	F-box family protein	3.91	4E-05
AT3G02840	immediate-early fungal elicitor family protein	3.91	2E-03
AT4G24380	unknown protein	3.89	6E-05
AT5G47220	ERF2	3.88	5E-06
AT1G43160	RAP2.6	3.88	2E-09
AT4G31800	WRKY18	3.88	2E-06
AT3G12580	HSP70	3.87	1E-10
AT1G28480	GRX480	3.85	5E-04
AT5G03720	AT-HSFA3	3.85	3E-11
AT5G05410	DREB2A	3.84	3E-07
AT1G19210	AP2 domain-containing transcription factor, putative	3.83	4E-03
AT3G43250	cell cycle control protein-related	3.83	4E-05
AT3G22910	calcium-transporting ATPase	3.82	1E-07
AT5G12030	AT-HSP17.6A	3.81	1E-04
AT5G52760	heavy-metal-associated domain-containing protein	3.80	6E-05
AT3G01830	calmodulin-related protein, putative	3.78	3E-03
AT2G47950	unknown protein	3.78	6E-10
AT1G60190	armadillo/beta-catenin repeat family protein	3.74	4E-07
AT5G06860	PGIP1	3.74	1E-09
AT1G12610	DDF1	3.73	2E-03
no match	no match	3.72	3E-07
AT3G22370	AOX1A	3.72	4E-13
AT5G51990	CBF4	3.72	1E-08
AT5G16010	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein	3.70	9E-11
AT2G32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	3.70	7E-07

AT4G25480	DREB1A	3.67	1E-11
AT1G09950	transcription factor-related	3.67	9E-05
AT5G43620	S-locus protein-related	3.65	4E-05
AT1G72520	lipoxygenase, putative	3.64	2E-04
AT2G47520	AP2 domain-containing transcription factor, putative	3.63	1E-10
AT2G41100	TCH3	3.63	5E-06
AT4G22610	protease inhibitor/seed storage/ (LTP) family protein	3.62	2E-06
AT5G63790	ANAC102	3.62	1E-10
AT2G26530	AR781	3.61	2E-04
AT3G51750	unknown protein	3.60	1E-12
AT2G47190	MYB2	3.60	5E-07
AT1G01480	ACS2	3.59	1E-09
AT2G29380	protein phosphatase 2C, putative	3.58	2E-12
AT2G32140	transmembrane receptor	3.57	3E-04
AT5G59490	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	3.57	1E-05
no match	no match	3.57	8E-08
AT5G66400	RAB18	3.56	7E-13
AT5G57560	TCH4	3.53	4E-04
AT1G62570	FMO GS-OX4	3.52	1E-12
AT5G19875	unknown protein	3.51	1E-13
AT5G03210	unknown protein	3.50	1E-08
AT2G46830	CCA1	3.47	1E-12
AT1G54050	17.4 kDa class III heat shock protein	3.47	1E-06
AT3G62100	IAA30	3.46	1E-13
AT2G17660	nitrate-responsive NOI protein, putative	3.44	2E-05
AT5G43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	3.43	1E-10
AT2G34930	disease resistance family protein	3.42	1E-05
AT1G73480	hydrolase, alpha/beta fold family protein	3.41	1E-13
AT2G32190	unknown protein	3.41	4E-07
AT5G63130	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	3.41	3E-07
AT2G20560	DNAJ heat shock family protein	3.40	8E-08
AT4G27410	RD26	3.39	2E-11
AT4G34470	ASK12	3.39	8E-12
AT1G52690	late embryogenesis abundant protein, putative	3.38	5E-07
AT3G24310	MYB305	3.38	1E-13
AT1G69920	ATGSTU12	3.37	1E-07
AT1G80820	CCR2	3.36	4E-08
AT2G36640	ATECP63	3.36	4E-10
AT2G46400	WRKY46	3.35	6E-04

AT1G66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	3.35	4E-06
AT4G27657	unknown protein	3.35	3E-04
AT4G29780	unknown protein	3.34	2E-03
AT4G24960	ATHVA22D	3.32	2E-16
AT5G52640	ATHSP90.1	3.31	1E-07
AT2G29480	ATGSTU2	3.31	1E-11
AT5G39580	peroxidase, putative	3.31	7E-09
AT5G22530	unknown protein	3.29	1E-05
AT5G54490	PBP1	3.29	2E-06
AT5G59480	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	3.26	1E-10
AT1G26730	EXS family protein / ERD1/XPR1/SYG1 family protein	3.25	1E-07
AT3G48450	nitrate-responsive NOI protein, putative	3.25	1E-08
AT5G15960	KIN1	3.25	6E-08
AT2G34600	JAZ7	3.24	4E-03
AT2G01300	unknown protein	3.24	2E-05
AT2G14290	F-box family protein	3.24	4E-04
AT3G48510	unknown protein	3.21	2E-12
AT3G29670	transferase family protein	3.20	5E-09
AT1G44350	ILL6	3.19	4E-08
AT3G45960	ATEXLA3	3.17	3E-04
AT5G40390	SIP1	3.17	2E-13
AT2G22880	VQ motif-containing protein	3.17	1E-03
AT2G43620	chitinase, putative	3.16	7E-10
AT1G56060	unknown protein	3.16	1E-05
AT5G62430	CDF1	3.15	2E-13
AT4G19460	glycosyl transferase family 1 protein	3.14	2E-12
AT4G13480	AtMYB79	3.13	8E-11
AT3G09350	armadillo/beta-catenin repeat family protein	3.11	1E-11
AT2G46790	APRR9	3.11	7E-12
AT5G54300	unknown protein	3.09	5E-09
AT1G73510	unknown protein	3.09	1E-06
AT4G14680	APS3	3.08	2E-09
AT4G11280	ACS6	3.07	4E-05
AT4G25470	CBF2	3.07	9E-04
AT4G01026	unknown protein	3.06	2E-13
AT4G23190	CRK11	3.05	2E-08
AT5G52750	heavy-metal-associated domain-containing protein	3.05	4E-04
AT3G29575	AFP3	3.03	3E-13
AT5G62520	SRO5	3.03	8E-05
AT4G12400	stress-inducible protein, putative	3.02	2E-09
AT3G02800	phosphatase/ phosphoprotein phosphatase/ protein tyrosine phosphatase	3.01	2E-08

AT3G16530	legume lectin family protein	3.00	3E-08
-----------	------------------------------	------	-------

Tabelle 8.3: **Gene, die im WT nach 6 h Salzstress hochreguliert sind:** Die Tabelle zeigt die Gene, die in der Microarray Analyse nach 6 h Salzstress am stärksten ($> \log_2(3)$) induziert waren.

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	P-Wert
AT2G41730	unknown protein	7.82	5E-20
AT4G37370	CYP81D8	7.13	2E-16
AT1G56600	AtGolS2	7.11	2E-19
AT3G02480	ABA-responsive protein-related	7.02	3E-15
AT4G37710	VQ motif-containing protein	6.95	6E-11
AT5G43450	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	6.95	3E-16
AT5G20230	ATBCB	6.85	2E-08
AT3G22830	AT-HSFA6B	6.82	3E-15
AT2G23170	GH3.3	6.72	2E-19
AT3G15670	LEA- protein, putative	6.68	3E-15
AT5G06760	LEA group 1 domain-containing protein	6.50	1E-12
AT2G26150	ATHSFA2	6.48	1E-12
AT5G51440	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein	6.32	1E-12
AT1G07430	protein phosphatase 2C, putative	6.25	6E-16
AT3G53600	zinc finger (C2H2 type) family protein	6.17	2E-10
AT5G11110	ATSPS2F	6.07	6E-17
AT2G02000	GAD3	6.06	2E-11
AT2G03760	ST; brassinosteroid sulfotransferase/ sulfotransferase	6.04	3E-20
AT2G04050	MATE efflux family protein	5.96	1E-15
AT5G28510	BGLU24	5.94	2E-11
AT2G29450	ATGSTU5	5.93	6E-11
AT1G05680	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	5.87	1E-10
AT2G29460	ATGSTU4	5.85	2E-12
AT5G66400	RAB18	5.83	6E-17
AT4G25480	DREB1A	5.80	2E-15
AT2G15780	glycine-rich protein	5.80	1E-14
AT3G51750	unknown protein	5.75	2E-16
AT2G24850	TAT3	5.70	4E-08
AT3G06490	MYB108	5.58	5E-11
AT1G52890	ANAC019	5.56	4E-10
AT1G52690	LEA protein, putative	5.56	1E-10
AT1G70130	lectin protein kinase, putative	5.54	3E-08

AT1G01480	ACS2	5.50	7E-13
AT3G50930	BCS1	5.49	4E-06
AT5G19110	extracellular dermal glycoprotein-related / EDGP-related	5.48	2E-10
AT3G60140	DIN2	5.46	6E-14
AT4G15100	scpl30	5.44	7E-11
AT2G46830	CCA1	5.44	3E-16
AT3G44860	FAMT	5.42	4E-08
AT3G14440	NCED3	5.41	1E-12
AT3G25250	AGC2-1	5.37	1E-07
AT5G13220	JAZ10	5.35	5E-08
AT1G59860	17.6 kDa class I heat shock protein	5.30	2E-07
AT1G09930	ATOPT2	5.23	6E-14
AT1G43160	RAP2.6	5.22	1E-11
AT3G63060	EDL3 (EID1-like 3)	5.22	3E-15
AT1G22810	AP2 domain-containing transcription factor, putative	5.20	1E-09
AT2G32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	5.17	4E-09
AT3G22370	AOX1A	5.17	9E-16
AT2G44840	ERF13	5.16	7E-05
AT3G22910	calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type, putative	5.14	8E-10
AT5G52400	CYP715A1	5.11	3E-09
AT5G17460	unknown protein	5.10	1E-17
AT5G42380	CML37	5.10	9E-05
AT2G29380	protein phosphatase 2C, putative	5.05	3E-15
AT1G17180	ATGSTU25	4.99	7E-13
AT5G52760	heavy-metal-associated domain-containing protein	4.99	2E-06
AT3G28210	PMZ	4.97	8E-09
AT1G66090	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	4.96	1E-08
AT2G38240	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	4.95	3E-09
AT3G17110	pseudogene, glycine-rich protein	4.94	1E-11
AT2G47520	AP2 domain-containing transcription factor, putative	4.94	6E-13
AT1G32970	subtilase family protein	4.94	3E-07
AT3G49620	DIN11	4.91	3E-10
AT2G26380	disease resistance protein-related / LRR protein-related	4.86	6E-09
AT5G06860	PGIP1	4.85	1E-11
AT4G25490	CBF1	4.81	2E-06
AT1G14540	anionic peroxidase, putative	4.79	7E-11

AT1G69920	ATGSTU12	4.77	5E-10
AT1G56060	unknown protein	4.76	4E-08
AT2G21640	unknown function / marker for oxidative stress response.	4.73	4E-12
AT1G32350	AOX1D	4.70	9E-12
AT1G77450	anac032	4.68	2E-12
AT1G71000	heat shock protein binding	4.67	7E-11
AT2G47770	benzodiazepine receptor-related	4.65	3E-13
AT3G17690	ATCNGC19	4.64	3E-08
AT1G64160	disease resistance-responsive family protein	4.63	2E-07
AT5G48850	ATSDI1	4.62	4E-14
AT1G07500	unknown protein	4.56	3E-10
AT3G12580	HSP70	4.56	7E-12
AT5G52310	LTI78	4.54	1E-13
AT1G10370	ERD9	4.52	5E-15
AT3G60120	BGLU27	4.51	9E-09
AT3G12510	unknown protein	4.51	1E-18
AT5G15950	adenosylmethionine decarboxylase family protein	4.50	4E-16
AT3G55090	ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	4.49	3E-09
AT1G17380	JAZ5	4.48	1E-05
AT4G16680	RNA helicase, putative	4.47	4E-12
AT5G64870	FUNCTIONS IN: molecular function unknown		
AT5G57510	unknown protein	4.46	8E-06
AT3G28600	ATP binding / ATPase	4.46	1E-09
AT5G39580	peroxidase, putative	4.45	4E-11
AT5G62490	ATHVA22B	4.44	7E-13
no match	no match	4.42	3E-09
AT1G74870	protein binding / zinc ion binding	4.40	8E-12
AT5G59220	protein phosphatase 2C, putative	4.40	5E-12
AT3G62100	IAA30	4.39	1E-15
AT2G46790	APRR9	4.37	1E-14
AT3G60420	LOCATED IN: cellular component unknown	4.35	4E-10
AT3G49580	LSU1	4.34	2E-12
AT5G26340	MSS1	4.33	2E-12
AT5G13320	PBS3	4.33	2E-08
AT1G28480	GRX480	4.30	1E-04
AT1G01720	ATAF1	4.28	1E-08
AT2G35980	YLS9	4.28	4E-11
AT1G61340	F-box family protein	4.25	2E-05
AT4G34300	glycine-rich protein	4.24	1E-12
AT4G35190	unknown protein	4.24	1E-11

AT3G30210	MYB121	4.24	1E-13
AT5G13080	WRKY75r	4.24	3E-10
AT1G74930	ORA47	4.23	6E-04
AT5G28520	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	4.22	1E-08
AT1G80840	WRKY40	4.21	5E-04
AT2G41100	TCH3	4.21	6E-07
AT1G68620	hydrolase	4.19	5E-09
AT3G23250	MYB15	4.19	4E-04
AT3G16530	legume lectin family protein	4.19	9E-11
AT4G24380	unknown protein	4.18	3E-05
AT5G52050	MATE efflux protein-related	4.15	7E-05
AT2G04070	antiporter/ drug transporter/ transporter	4.15	5E-13
AT4G31800	WRKY18	4.12	8E-07
AT2G32140	transmembrane receptor	4.12	6E-05
AT5G52750	heavy-metal-associated domain-containing protein	4.11	1E-05
AT2G37430	zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT11)	4.11	4E-06
no match	no match	4.10	6E-08
AT5G16010	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein	4.08	2E-11
AT4G25470	CBF2	4.07	4E-05
AT3G61400	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	4.04	3E-09
AT1G21120	O-methyltransferase, putative	4.03	1E-08
AT4G28140	AP2 domain-containing transcription factor, putative	4.03	1E-14
AT5G63790	ANAC102	4.03	2E-11
AT5G54300	unknown protein	4.02	5E-11
AT2G30140	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	4.02	1E-13
AT5G15960	KIN1	4.02	2E-09
AT1G49450	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	4.01	4E-13
AT4G33666	unknown protein	4.01	6E-12
AT3G02840	immediate-early fungal elicitor family protein	3.98	2E-03
AT5G54490	PBP1	3.98	1E-07
AT4G19460	glycosyl transferase family 1 protein	3.97	2E-14
AT5G03210	unknown protein	3.97	1E-09
AT4G21680	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	3.97	9E-15
AT1G62570	FMO GS-OX4	3.96	1E-13
AT5G47220	ERF2	3.96	4E-06
AT2G26530	AR781	3.95	8E-05
AT3G12320	unknown protein	3.93	5E-14

AT1G78070	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	3.92	4E-11
AT2G26560	PLA2A	3.92	4E-11
AT2G47950	unknown protein	3.91	3E-10
AT5G59540	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	3.90	2E-10
AT1G73480	hydrolase, alpha/beta fold family protein	3.90	9E-15
AT3G25760	AOC1	3.89	5E-06
AT3G11020	DREB2B	3.89	5E-09
AT1G69490	NAP	3.88	1E-11
AT5G17300	myb family transcription factor	3.88	1E-13
AT3G48510	unknown protein	3.87	7E-14
AT3G43250	cell cycle control protein-related	3.87	3E-05
AT3G09405	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	3.86	1E-12
AT5G52640	ATHSP90.1	3.86	9E-09
AT4G18350	NCED2	3.85	4E-09
AT2G47190	MYB2	3.85	2E-07
AT5G43620	S-locus protein-related	3.85	2E-05
AT4G05020	NDB2	3.84	2E-14
AT5G12030	AT-HSP17.6A	3.83	1E-04
AT4G27410	RD26	3.81	2E-12
AT5G66640	DAR3 (DA1-RELATED PROTEIN 3)	3.81	2E-08
AT5G07010	ST2A	3.81	2E-10
AT1G26380	FAD-binding domain-containing protein	3.80	2E-10
AT4G23190	CRK11	3.79	5E-10
AT3G48450	nitrate-responsive NOI protein, putative	3.78	8E-10
AT4G28110	AtMYB41	3.78	7E-11
AT4G34410	RRTF1	3.76	7E-03
AT4G28460	unknown protein	3.75	1E-07
AT2G32190	unknown protein	3.74	1E-07
AT3G28580	AAA-type ATPase family protein	3.73	2E-06
AT2G18190	AAA-type ATPase family protein	3.73	1E-14
AT2G29480	ATGSTU2	3.73	2E-12
AT2G37870	protease inhibitor/seed storage LTP family protein	3.72	4E-09
AT4G28703	FUNCTIONS IN: molecular function unknown	3.71	1E-11
AT5G62430	CDF1	3.71	7E-15
AT3G25655	IDL1	3.71	1E-07
AT4G33905	peroxisomal membrane protein 22 kDa, putative	3.71	2E-10
AT1G80820	CCR2	3.71	9E-09
AT5G05410	DREB2A	3.70	6E-07
AT2G02990	RNS1	3.70	2E-12
no match	no match	3.69	1E-08
AT5G57500	transferase, transferring glycosyl groups	3.69	3E-14
AT2G29440	ATGSTU6	3.67	2E-10

AT5G57560	TCH4	3.66	3E-04
AT1G60190	armadillo/beta-catenin repeat family protein	3.66	5E-07
AT3G01830	calmodulin-related protein, putative	3.66	4E-03
AT3G29575	AFP3	3.66	8E-15
AT5G54470	zinc finger (B-box type) family protein	3.65	3E-12
AT3G23240	ERF1	3.65	8E-09
AT5G24110	WRKY30	3.64	5E-07
AT5G57220	CYP81F2	3.63	3E-08
AT4G12400	stress-inducible protein, putative	3.63	7E-11
AT1G12610	DDF1	3.59	3E-03
AT2G38340	AP2 domain-containing transcription factor, putative (DRE2B)	3.58	2E-10
AT1G68765	IDA	3.58	6E-07
AT3G29670	transferase family protein	3.58	7E-10
AT2G23270	unknown protein	3.57	5E-06
AT4G14680	APS3	3.57	1E-10
AT3G09350	armadillo/beta-catenin repeat family protein	3.57	8E-13
AT4G29780	unknown protein	3.56	1E-03
AT3G02800	phosphatase/ phosphoprotein phosphatase	3.56	1E-09
AT2G31180	MYB14	3.55	3E-12
AT5G22530	unknown protein	3.55	5E-06
AT5G59490	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	3.55	1E-05
AT4G18170	WRKY28	3.53	2E-12
AT5G64120	peroxidase, putative	3.52	1E-11
AT2G43620	chitinase, putative	3.52	1E-10
AT1G32870	ANAC13	3.52	7E-15
AT1G54050	17.4 kDa class III heat shock protein	3.52	1E-06
AT4G05100	AtMYB74	3.51	2E-10
AT5G03720	AT-HSFA3	3.50	2E-10
AT4G11280	ACS6	3.50	8E-06
AT1G01560	ATMPK11	3.49	2E-09
AT5G37260	RVE2 (REVEILLE 2); DNA binding / transcription factor	3.49	7E-13
AT1G17170	ATGSTU24	3.49	6E-13
AT2G14290	F-box family protein	3.48	2E-04
AT1G35210	unknown protein	3.48	6E-05
AT5G04370	NAMT1	3.48	7E-10
AT2G20560	DNAJ heat shock family protein	3.46	6E-08
AT3G26830	PAD3	3.46	2E-12
AT5G14730	unknown protein	3.46	9E-06
AT4G01870	tolB protein-related	3.45	2E-10
AT4G34470	ASK12	3.45	5E-12

AT3G01970	WRKY45	3.43	5E-13
AT5G60350	unknown protein	3.42	8E-08
AT1G59740	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	3.42	6E-12
AT4G25810	XTR6	3.41	1E-04
AT5G63130	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	3.40	4E-07
AT4G17785	MYB39	3.40	3E-09
AT3G54150	embryo-abundant protein-related	3.39	2E-06
AT3G47780	ATATH6	3.38	1E-10
AT1G44350	ILL6	3.35	2E-08
AT2G17040	anac036	3.34	1E-10
AT5G22270	unknown protein	3.34	2E-14
AT1G05100	MAPKKK18	3.34	1E-08
AT2G22880	VQ motif-containing protein	3.34	7E-04
AT5G18470	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	3.33	2E-06
AT4G14365	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / ankyrin repeat family protein	3.33	5E-06
AT3G47340	ASN1	3.32	2E-09
AT5G39610	ATNAC6	3.32	2E-13
AT2G46400	WRKY46	3.32	7E-04
AT5G51990	CBF4	3.31	6E-08
AT3G46110	unknown protein	3.31	2E-11
AT1G01060	LHY	3.31	7E-11
AT2G42540	COR15A	3.30	4E-09
AT2G15490	UGT73B4	3.30	2E-09
AT1G72520	lipoxygenase, putative	3.29	4E-04
AT2G17660	nitrate-responsive NOI protein, putative	3.29	4E-05
AT4G16820	lipase class 3 family protein	3.28	3E-10
AT3G55970	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	3.28	1E-08
AT4G23180	CRK10	3.28	2E-07
AT1G12950	MATE efflux family protein	3.28	2E-08
AT2G01300	unknown protein	3.27	2E-05
AT5G40390	SIP1	3.27	1E-13
AT4G12480	pEARLI 1	3.27	1E-11
AT3G62260	protein phosphatase 2C, putative	3.27	2E-05
AT3G59900	ARGOS	3.27	1E-10
AT3G56710	SIB1	3.27	8E-06
AT1G14120	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	3.25	1E-08
AT4G13480	AtMYB79	3.25	4E-11
AT3G17790	PAP17	3.25	1E-11
AT5G40990	GLIP1	3.25	3E-10

AT4G22610	protease inhibitor/seed storage/LTP family protein	3.24	1E-05
AT3G51895	SULTR3;1	3.24	2E-08
no match	no match	3.24	2E-08
AT3G58190	LBD29	3.24	1E-11
AT3G15500	ANAC055	3.24	3E-11
AT4G11350	transferase, transferring glycosyl groups	3.24	2E-10
AT2G04040	TX1	3.22	8E-10
AT4G24960	ATHVA22D	3.22	3E-16
AT2G41380	embryo-abundant protein-related	3.21	5E-10
AT4G12430	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	3.21	8E-11
AT5G67340	armadillo/beta-catenin repeat family protein	3.18	2E-10
AT1G68500	unknown protein	3.17	5E-10
AT1G02850	BGLU11	3.17	6E-14
AT4G31780	MGD1	3.16	7E-09
AT5G59820	RHL41	3.16	9E-05
AT5G13330	Rap2.6L	3.16	3E-08
AT3G55630	ATDFD	3.16	4E-14
AT2G36640	ATECP63	3.16	1E-09
AT3G01420	DOX1	3.15	5E-12
AT4G15120	VQ motif-containing protein	3.15	6E-14
AT2G18660	EXLB3	3.14	8E-08
AT2G34850	MEE25	3.14	2E-12
AT5G14700	cinnamoyl-CoA reductase-related	3.14	9E-06
AT3G20300	unknown protein	3.13	1E-12
AT2G38250	DNA-binding protein-related	3.13	3E-10
AT3G24310	MYB305	3.13	5E-13
AT5G01380	transcription factor	3.12	7E-07
AT5G19875	unknown protein	3.12	1E-12
AT2G18210	unknown protein	3.12	3E-05
AT5G39050	transferase, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	3.11	2E-13
AT5G64905	PROPEP3	3.11	2E-04
AT5G48570	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	3.11	2E-09
AT2G34600	JAZ7	3.10	6E-03
AT3G53160	UGT73C7	3.10	7E-14
AT5G22540	unknown protein	3.08	1E-07
AT2G27550	ATC	3.08	1E-09
AT4G30430	TET9	3.07	2E-04
AT3G23220	DNA binding / transcription factor	3.07	2E-05
AT2G30040	MAPKKK14	3.06	6E-05
AT4G01026	unknown protein	3.06	2E-13
AT1G74080	MYB122	3.06	6E-11

AT4G11480	protein kinase family protein	3.06	2E-08
AT3G45960	ATEXLA3	3.05	4E-04
AT4G37770	ACS8	3.04	2E-11
AT1G73510	unknown protein	3.03	1E-06
AT5G65600	legume lectin family protein / protein kinase family protein	3.01	6E-10
AT1G30040	ATGA2OX2	3.01	7E-11
AT1G74310	ATHSP101	3.01	3E-06
AT2G35770	scpl28	3.00	5E-12
AT5G13200	GRAM domain-containing protein	3.00	6E-07

8.5 Daten der Microarrayanalyse der *bzip1/bzip53*-Mutante nach Salzstress

Tabelle 8.4: **Herrunterregulierte Gene in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante nach 3 h Salzstress:** Die Tabelle zeigt die Gene, die in der Microarray Analyse in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante nach 3 h Salzstress am stärksten differentiell zum WT ($> \log_2(0,7)$) reguliert waren.

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	P-Wert
AT5G49450	AtbZIP1 (BASIC LEUCINE-ZIPPER 1)	-3.94	9E-15
AT2G34390	NIP2;1 (NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 2;1)	-2.64	5E-04
AT3G62420	AtbZIP53 (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 53)	-2.14	5E-15
AT3G29970	germination protein-related	-2.10	6E-04
AT5G66985	unknown protein	-2.06	9E-05
AT2G42250	CYP712A1 (CYTOCHROME P450, FAMILY 712, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE)	-1.97	4E-07
AT2G17850	FUNCTIONS IN: molecular <i>function unknown</i>	-1.94	7E-04
AT4G10270	wound-responsive family protein	-1.83	1E-03
AT1G18970	GLP4 (GERMIN-LIKE PROTEIN 4)	-1.79	9E-06
AT3G43190	SUS4(SUCROSE SYNTHASE 4)	-1.73	4E-05
AT4G33560	unknown protein	-1.72	2E-05
AT5G26200	mitochondrial substrate carrier family protein	-1.67	8E-05
AT1G08090	ATNRT2:1 (NITRATE TRANSPORTER 2:1)	-1.66	3E-06
AT1G43800	SAD6 (STEAROYL-ACYL CARRIER PROTEIN D9-DESATURASE 6)	-1.64	5E-05
AT5G06900	CYP93D1 (CYTOCHROME P450, FAMILY 93, SUBFAMILY D, POLYPEPTIDE)	-1.60	7E-06
AT5G39890	unknown protein	-1.59	4E-04
AT1G52820	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	-1.56	8E-06

AT5G10040	unknown protein	-1.55	6E-03
AT5G50590	AtHSD4 (hydroxysteroid dehydrogenase 4)	-1.54	3E-06
AT1G52800	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-1.50	6E-06
AT3G10040	transcription factor	-1.47	4E-04
AT1G33055	unknown protein	-1.46	1E-03
AT1G52790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-1.42	8E-06
AT4G30110	HMA2 (HEAVY METAL ATPASE 2)	-1.41	9E-07
AT3G52970	CYP76G1 (CYTOCHROME P450, FAMILY 76, SUBFAMILY G)	-1.37	3E-07
AT2G30750	CYP71A12 (CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A)	-1.35	7E-04
AT1G80320	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-1.31	2E-05
AT5G15120	unknown protein	-1.28	2E-04
AT3G02550	LBD41 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41)	-1.28	2E-03
AT3G27220	kelch repeat-containing protein	-1.27	4E-04
AT4G12510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1.27	9E-06
AT1G48750	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-1.25	1E-05
AT1G73602	CPuORF32 (Conserved peptide upstream open reading frame 32)	-1.22	5E-06
AT5G01740	FUNCTIONS IN: molecular <i>function unknown</i>	-1.22	5E-03
AT2G34490	CYP710A2 (CYTOCHROME P450, FAMILY 710, SUBFAMILY A)	-1.20	8E-05
AT3G26330	CYP71B37 (CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B)	-1.20	3E-06
AT5G04950	NAS1 (NICOTIANAMINE SYNTHASE 1)	-1.20	9E-04
AT2G16060	AHB1 (ARABIDOPSIS HEMOGLOBIN 1)	-1.18	2E-05
AT5G43360	PHT3 (PHOSPHATE TRANSPORTER 3)	-1.17	3E-04
AT5G37450	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-1.15	4E-04
AT4G24670	TAR2 (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED 2)	-1.15	7E-06
<i>no_match</i>	<i>no_match</i>	-1.15	4E-03
AT5G53880	unknown protein	-1.14	1E-06
AT2G19590	ACO1 (ACC OXIDASE 1)	-1.13	7E-05
AT1G14120	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	-1.13	5E-03
AT4G14980	INVOLVED IN: intracellular signaling cascade	-1.12	9E-05
AT3G03270	universal stress protein (USP) family protein / early nodulin ENOD18 family protein	-1.12	6E-05
AT2G23410	ACPT (CIS-PRENYLTRANSFERASE 3)	-1.12	4E-06
AT4G33070	pyruvate decarboxylase, putative	-1.12	3E-03

AT3G30260	AGL79 (AGAMOUS-LIKE 79)	-1.10	5E-05
AT5G05250	unknown protein	-1.09	3E-05
AT5G54040	DC1 domain-containing protein	-1.08	6E-06
AT2G19970	pathogenesis-related protein, putative	-1.08	4E-05
AT1G49470	unknown protein	-1.08	6E-03
AT5G61420	MYB28 (MYB DOMAIN PROTEIN 28)	-1.07	2E-05
AT5G14650	polygalacturonase, putative / pectinase, putative	-1.06	3E-04
AT4G12030	bile acid:sodium symporter family protein	-1.05	1E-05
AT1G68040	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	-1.05	1E-04
AT3G27950	early nodule-specific protein, putative	-1.04	4E-07
AT1G72360	ethylene-responsive element-binding protein, putative	-1.04	3E-03
AT4G13770	CYP83A1 (CYTOCHROME P450 83A1)	-1.04	4E-05
AT1G07880	ATMPK13; MAP kinase/ kinase	-1.03	9E-05
AT1G16410	CYP79F1 (CYTOCHROME P450 79F1)	-1.03	4E-06
AT3G20015	aspartic-type endopeptidase	-1.03	8E-06
AT1G24280	G6PD3 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 3)	-1.03	2E-06
AT2G19990	PR-1-LIKE (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN-1-LIKE)	-1.03	1E-04
AT4G33950	OST1 (OPEN STOMATA 1)	-1.02	5E-05
AT1G32450	NRT1.5 (NITRATE TRANSPORTER 1.5)	-1.02	2E-05
AT5G35190	proline-rich extensin-like family protein	-1.01	2E-03
AT4G03210	XTH9 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 9)	-1.01	4E-08
AT2G36570	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-0.99	5E-06
AT3G45160	unknown protein	-0.99	5E-07
AT1G55810	uracil phosphoribosyltransferase, putative / UMP pyrophosphorylase, putative / UPRTase, putative	-0.98	2E-04
AT1G68880	ATbZIP8 (BASIC LEUCINE-ZIPPER 8)	-0.98	2E-04
AT1G44050	DC1 domain-containing protein	-0.97	3E-05
AT5G04960	pectinesterase family protein	-0.96	4E-03
AT2G28960	leucine-rich repeat protein kinase, putative	-0.96	9E-05
AT3G45070	sulfotransferase family protein	-0.96	5E-06
AT5G50200	WR3 (WOUND-RESPONSIVE 3)	-0.96	2E-05
AT3G07970	QRT2 (QUARTET 2)	-0.96	1E-04
AT4G31730	GDU1 (GLUTAMINE DUMPER 1)	-0.96	5E-03
AT1G03870	FLA9 (FASCICLIN-LIKE ARABINOOGALACTAN 9)	-0.95	5E-05
AT2G43550	trypsin inhibitor, putative	-0.95	7E-06

AT4G11650	ATOSM34 (OSMOTIN 34)	-0.95	9E-04
AT5G14920	gibberellin-regulated family protein	-0.94	2E-06
AT3G23340	CKL10 (CASEIN KINASE I-LIKE 10)	-0.93	9E-06
AT4G31910	transferase family protein	-0.93	1E-05
AT2G38600	acid phosphatase class B family protein	-0.93	2E-04
AT1G78090	ATTPPB (TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE)	-0.93	1E-04
AT5G51310	gibberellin 20-oxidase-related	-0.92	4E-05
AT2G35920	helicase domain-containing protein	-0.92	8E-09
AT1G77120	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)	-0.92	2E-03
AT5G54130	calcium-binding EF hand family protein	-0.92	1E-06
AT2G43535	trypsin inhibitor, putative	-0.92	5E-07
AT1G64780	ATAMT1;2 (AMMONIUM TRANSPORTER 1;2)	-0.92	2E-04
AT1G65900	unknown protein	-0.91	5E-05
AT1G35260	MLP165 (MLP-LIKE PROTEIN 165)	-0.91	6E-06
AT2G35150	EXL1 (EXORDIUM LIKE 1)	-0.91	6E-04
AT3G46330	MEE39 (maternal effect embryo arrest 39); kinase	-0.91	6E-04
AT1G49860	ATGSTF14; glutathione transferase	-0.91	8E-04
AT5G10580	unknown protein	-0.91	3E-06
AT1G78490	CYP708A3 (CYTOCHROME P450, FAMILY 708, SUBFAMILY A)	-0.90	7E-04
AT2G22920	serine carboxypeptidase S10 family protein	-0.90	1E-06
AT2G23600	ACL (ACETONE-CYANOHYDRIN LYASE)	-0.90	2E-05
AT2G42610	LSH10 (LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 10)	-0.90	1E-03
AT2G15790	SQN (SQUINT); peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-0.90	1E-07
AT1G67910	unknown protein	-0.89	3E-04
AT1G60680	aldo/keto reductase family protein	-0.89	5E-07
AT1G69160	unknown protein	-0.89	5E-05
AT1G48300	unknown protein	-0.89	6E-05
AT3G26210	CYP71B23 (CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B)	-0.89	7E-04
AT5G19890	peroxidase, putative	-0.88	2E-04
AT5G62720	integral membrane HPP family protein	-0.88	3E-05
AT5G60520	LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT)	-0.88	3E-06
AT3G03190	ATGSTF11 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F11)	-0.88	1E-04
AT4G11230	respiratory burst oxidase, putative / NADPH oxidase, putative	-0.88	5E-03
AT3G15353	MT3 (METALLOTHIONEIN 3)	-0.88	5E-08
AT1G30530	UGT78D1 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 78D1)	-0.87	6E-03

AT5G44730	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	-0.87	6E-05
AT2G33810	SPL3 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3)	-0.87	9E-04
AT5G45380	sodium:solute symporter family protein	-0.87	3E-05
AT2G31790	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0.87	3E-06
AT3G32040	geranylgeranyl pyrophosphate synthase, putative	-0.87	2E-05
AT3G23730	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	-0.87	1E-04
AT4G14060	major latex protein-related / MLP-related	-0.86	2E-04
ATMG00070	NADH dehydrogenase subunit 9	-0.86	4E-04
AT1G12110	NRT1.1; nitrate transmembrane transporter/ transporter	-0.86	7E-05
AT2G39730	RCA (RUBISCO ACTIVASE)	-0.86	1E-03
AT5G64700	nodulin MtN21 family protein	-0.85	2E-05
AT3G54260	unknown protein	-0.85	1E-05
AT2G28970	leucine-rich repeat protein kinase, putative	-0.85	2E-04
AT1G11545	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	-0.85	4E-06
AT2G43140	DNA binding / transcription factor	-0.85	3E-04
AT5G38010	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0.84	9E-04
AT4G22790	MATE efflux family protein	-0.84	3E-04
AT2G07699	pseudogene, similar to ATPase subunit 6	-0.84	1E-04
<i>no_match</i>	<i>no_match</i>	-0.83	8E-04
AT3G26450	major latex protein-related / MLP-related	-0.83	6E-03
AT3G06740	zinc finger (GATA type) family protein	-0.83	7E-07
AT2G23760	BLH4 (BEL1-LIKE HOMEODOMAIN 4)	-0.83	3E-04
AT5G49780	ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase	-0.83	5E-04
AT3G06390	integral membrane family protein	-0.82	8E-05
AT4G03280	PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER C)	-0.82	9E-03
AT5G54090	DNA mismatch repair MutS family protein	-0.82	2E-06
AT1G74470	geranylgeranyl reductase	-0.82	3E-05
AT1G15000	SCPL50 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 50)	-0.82	1E-06
AT5G19550	ASP2 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 2)	-0.82	2E-04
AT3G13760	DC1 domain-containing protein	-0.82	6E-04
AT3G10912	CPuORF63 (Conserved peptide upstream open reading frame 63)	-0.82	6E-04
AT2G36690	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-0.82	4E-03
AT1G02430	ATARFD1B (ADP-ribosylation factor D1B); GTP binding	-0.82	1E-05

AT1G22330	RNA binding / nucleic acid binding / nucleotide binding	-0.82	7E-03
AT2G26820	ATPP2-A3 (Phloem protein 2-A3)	-0.82	1E-03
<i>no_match</i>	<i>no_match</i>	-0.81	4E-04
AT4G35030	protein kinase family protein	-0.81	3E-03
AT2G41820	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-0.81	3E-06
ATCG00420	Encodes NADH dehydrogenase subunit J	-0.81	3E-03
AT5G48430	aspartic-type endopeptidase	-0.81	1E-03
AT5G65970	MLO10 (MILDEW RESISTANCE LOCUS O 10)	-0.81	5E-05
AT3G02885	GASA5 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 5)	-0.81	2E-04
AT2G36120	DOT1 (DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES 1)	-0.81	4E-04
AT5G44550	integral membrane family protein	-0.81	1E-05
AT3G51740	IMK2 (INFLORESCENCE MERISTEM RECEPTOR-LIKE KINASE 2)	-0.80	3E-05
AT5G53250	AGP22 (ARABINO GALACTAN PROTEIN 22)	-0.80	3E-03
AT1G28400	unknown protein	-0.80	2E-06
AT5G40850	UPM1 (UROPHORPHYRIN METHYLASE 1)	-0.80	7E-06
AT1G12090	ELP (EXTENSIN-LIKE PROTEIN)	-0.80	1E-05
AT1G19530	unknown protein	-0.80	1E-05
<i>no_match</i>	<i>no_match</i>	-0.80	1E-05
AT4G26130	unknown protein	-0.80	1E-04
AT4G34760	auxin-responsive family protein	-0.80	5E-03
AT3G57780	EXPRESSED IN: 20 plant structures	-0.80	7E-06
AT5G20640	unknown protein	-0.79	2E-04
AT3G58990	aconitase C-terminal domain-containing protein	-0.79	7E-04
AT1G07090	LSH6 (LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 6)	-0.79	4E-04
AT1G72430	auxin-responsive protein-related	-0.79	7E-05
AT2G15620	NIR1 (NITRITE REDUCTASE 1)	-0.79	3E-06
AT4G37540	LBD39 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 39)	-0.79	1E-03
AT1G18590	SOT17 (SULFOTRANSFERASE 17)	-0.79	4E-05
AT5G19530	ACL5 (ACAULIS 5)	-0.79	6E-05
AT5G19140	AILP1	-0.78	2E-04
AT5G59680	leucine-rich repeat protein kinase, putative	-0.78	5E-03
AT1G78020	senescence-associated protein-related	-0.78	1E-04
AT1G15380	lactoylglutathione lyase family protein	-0.78	2E-04
AT2G23560	MES7 (METHYL ESTERASE 7)	-0.78	1E-05
AT2G06925	PLA2-ALPHA (PHOSPHOLIPASE A2-ALPHA)	-0.78	7E-06
AT1G24575	unknown protein	-0.78	9E-04
ATMG00210	encodes a mitochondrial ribosomal protein L5, a constituent of the large subunit of the ribosomal complex	-0.78	1E-03

AT4G22160	unknown protein	-0.78	5E-06
ATMG01190	ATPase subunit 1	-0.78	1E-03
AT3G54390	transcription factor	-0.78	3E-06
AT3G63110	ATIPT3 (ARABIDOPSIS THALIANA ISOPENTENYLTRANSFERASE 3)	-0.78	5E-04
AT3G19370	LOCATED IN: plasma membrane	-0.77	9E-06
AT2G43100	aconitase C-terminal domain-containing protein	-0.77	2E-04
AT3G11930	universal stress protein (USP) family protein	-0.77	2E-04
ATMG01200	hypothetical protein	-0.77	9E-04
AT5G05180	unknown protein	-0.77	1E-04
AT1G24420	transferase family protein	-0.76	6E-03
AT4G12800	PSAL (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT L)	-0.76	9E-03
AT3G13610	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-0.76	9E-04
AT4G33720	pathogenesis-related protein, putative	-0.76	1E-02
AT2G14210	AGL44 (AGAMOUS-LIKE 44)	-0.76	3E-03
AT1G64640	plastocyanin-like domain-containing protein	-0.76	4E-05
AT3G10720	pectinesterase, putative	-0.76	9E-05
AT3G49860	ATARLA1B (ADP-ribosylation factor-like A1B)	-0.76	5E-06
AT5G24010	protein kinase family protein	-0.76	2E-04
AT5G28650	WRKY74 (WRKY DNA-BINDING PROTEIN 74)	-0.75	2E-04
AT4G25100	FSD1 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1)	-0.75	2E-04
AT5G43350	PHT1;1 (PHOSPHATE TRANSPORTER 1;1)	-0.75	7E-04
AT5G18840	sugar transporter, putative	-0.75	4E-05
AT5G23010	MAM1 (METHYLTHIOALKYLMALATE SYNTHASE 1)	-0.75	2E-03
AT4G30640	F-box family protein (FBL19)	-0.75	1E-03
AT4G09420	disease resistance protein (TIR-NBS class), putative	-0.75	3E-03
AT1G14210	ribonuclease T2 family protein	-0.75	6E-06
AT2G39310	JAL22 (JACALIN-RELATED LECTIN 22)	-0.75	4E-03
AT3G13840	scarecrow transcription factor family protein	-0.74	2E-03
ATMG00040	hypothetical protein	-0.74	2E-04
AT2G33850	unknown protein	-0.74	1E-03
AT4G26050	leucine-rich repeat family protein	-0.74	3E-03
AT5G61480	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-0.74	4E-06
AT1G78320	ATGSTU23 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 23)	-0.74	3E-04
AT3G54430	SRS6 (SHI-RELATED SEQUENCE 6)	-0.74	8E-05
AT4G02630	protein kinase family protein	-0.74	7E-07
AT2G21880	ATRAB7A (RAB GTPASE HOMOLOG 7A)	-0.74	2E-04
AT3G54040	photoassimilate-responsive protein-related	-0.74	5E-03
AT1G29660	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	-0.73	5E-05

AT5G11320	YUC4 (YUCCA4)	-0.73	3E-03
AT2G48030	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	-0.73	2E-05
AT2G45210	auxin-responsive protein-related	-0.73	4E-03
AT5G54140	ILL3; IAA-amino acid conjugate hydrolase/ metallo-peptidase	-0.73	1E-05
AT5G17880	CSA1 (CONSTITUTIVE SHADE-AVOIDANCE1)	-0.73	2E-06
AT4G25310	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-0.73	1E-03
AT5G54770	THI1; protein homodimerization	-0.73	2E-03
AT4G39770	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	-0.72	9E-04
AT5G57530	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	-0.72	4E-03
AT1G68740	EXS family protein / ERD1/XPR1/SYG1 family protein	-0.72	2E-03
AT5G54130	calcium-binding EF hand family protein	-0.72	3E-03
AT3G19710	BCAT4 (BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4)	-0.72	2E-04
AT2G38970	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-0.72	1E-04
AT5G60100	APRR3 (ARABIDOPSIS PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 3)	-0.72	4E-06
AT3G62040	catalytic/ hydrolase	-0.72	8E-05
AT2G24762	AtGDU4 (Arabidopsis thaliana GLUTAMINE DUMPER 4)	-0.72	2E-03
AT5G51550	EXL3 (EXORDIUM LIKE 3)	-0.72	5E-05
AT3G58550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-0.71	1E-04
AT3G25130	unknown protein	-0.71	2E-03
AT3G62280	carboxylesterase/ hydrolase, acting on ester bonds	-0.71	6E-05
AT2G03720	MRH6 (MORPHOGENESIS OF ROOT HAIR 6)	-0.71	9E-03
AT3G31415	terpene synthase/cyclase family protein	-0.71	5E-04
AT1G13420	ST4B (SULFOTRANSFERASE 4B)	-0.71	3E-04
AT1G01170	ozone-responsive stress-related protein, putative	-0.71	1E-04
AT4G27450	unknown protein	-0.71	7E-04
AT5G20250	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10)	-0.71	1E-03
AT1G66020	terpene synthase/cyclase family protein	-0.71	1E-04
AT5G53320	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	-0.71	2E-05
AT1G09750	chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related	-0.70	8E-04
AT1G10070	ATBCAT-2 (ARABIDOPSIS THALIANA BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2)	-0.70	4E-03
AT5G01870	lipid transfer protein, putative	-0.70	4E-04

Tabelle 8.5: **Herrunterregulierte Gene in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante nach 6 h Salzstress:** Die Tabelle zeigt die Gene, die in der Microarray Analyse in der *bzip1/bzip53*-Doppelmutante nach 6 h Salzstress am stärksten differentiell zum WT ($> \log_2(0,7)$) reguliert waren.

AT-Nummer	Name	Induktion (log2)	P-Wert
AT5G49450	AtbZIP1 (BASIC LEUCINE-ZIPPER 1)	-5.24	4E-17
AT3G62420	AtbZIP53 (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 53)	-1.93	4E-14
AT3G28007	SWEET4 putative sugar Transporter	-1.90	2E-06
AT3G60140	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2)	-1.80	6E-06
AT4G35770	SEN1 (SENESCENCE Associated1)	-1.60	2E-04
AT2G40670	ARR16 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 16)	-1.55	7E-07
AT5G34780	BCDH (Branched-Chain alpha-Keto Acid Dehydrogenase E1 alpha subunit, putative)	-1.52	2E-05
AT4G12480	EARLI 1, induced by abiotic stress	-1.43	7E-06
AT1G10070	BCAT-2 (BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2)	-1.39	2E-06
AT1G80160	lactoylglutathione lyase family protein / glyoxalase I family protein	-1.38	5E-09
AT2G22990	SNG1 (SINAPOYLGLUCOSE 1)	-1.38	2E-04
AT1G15040	Glutamine Amidotransferase-related	-1.29	1E-04
AT4G15530	PPDK (Pyruvate-Orthophosphate Dikinase)	-1.29	2E-06
AT1G03090	MCCA (Methylcrotonoyl-CoA Carboxylase)	-1.28	5E-07
AT5G54080	HGO (HOMOGENITISATE 1,2-DIOXYGENASE)	-1.26	1E-08
AT1G64660	ATMGL (ARABIDOPSIS THALIANA METHIONINE GAMMA-LYASE)	-1.21	4E-04
AT3G47340	ASN1 (GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1)	-1.19	1E-03
AT5G52300	RD29B (RESPONSIVE TO DESSICATION 29B), LTI65 (LOW-TEMPERATURE-INDUCED 65)	-1.16	7E-04
AT3G17520	LEA (Late Embryogenesis Abundant protein family protein)	-1.15	6E-04
AT5G49360	BXL1 (BETA-XYLOSIDASE 1)	-1.14	4E-05
AT3G06850	BCE2 (Dihydrolipoamide Branched Chain Acyltransferase), DIN3, LTA1	-1.13	2E-05
AT5G05390	LAC12 (Laccase 12)	-1.05	4E-03
AT3G59930	DEFL (Defensin-like family protein)	-1.04	1E-03
AT4G37220	Cold acclimation protein WCOR413 family	-1.04	4E-05
AT5G53970	TAT7 (Tyrosine Aminotransferase7)	-1.03	1E-05
AT1G23090	AST91 (SULFATE TRANSPORTER 91)	-0.97	2E-03
AT1G79700	WRI4 (WRINKLED4)	-0.96	7E-05

AT1G43670	FBP (Fructose-1,6-Bisphosphatase), FINS1 (Fructose Insensitive1)	-0.95	5E-07
AT4G28040	UMAMIT33 (USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 33)	-0.94	4E-03
AT5G01880	DAFL-2 (DAF-like Ringfinger)	-0.93	6E-06
AT5G23660	SWEET2, MtN3 transporter family (Arabidopsis homolog of Medicago truncatula MTN3)	-0.93	9E-03
AT3G26510	octicosapeptide/Phox/Bem1p (PB1) domain-containing protein	-0.91	9E-03
AT5G28640	AN3 (ANGUSTIFOLIA 3)	-0.91	2E-04
AT1G07040	unknown protein	-0.91	2E-07
AT1G58180	BCA6 (Carbonic Anhydrase 6)	-0.91	8E-05
AT5G23050	AAE17 (ACYL-ACTIVATING ENZYME 17)	-0.90	1E-05
AT5G57655	xylose isomerase family protein, Carbohydrate metabolism	-0.90	4E-04
AT4G33110	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-0.90	4E-04
AT5G03860	MLS (MALATE SYNTHASE)	-0.89	4E-05
AT3G14660	CYP72A13 (CYTOCHROME P450, FAMILY 72, SUBFAMILY A)	-0.89	4E-04
AT3G61210	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-0.87	6E-03
AT1G69490	ANAC29 (NAC-like transcription factor)	-0.86	6E-03
AT3G08860	PYD4 (PYRIMIDINE4)	-0.86	6E-04
AT5G51870	AGL71 (AGAMOUS-LIKE 71)	-0.86	1E-03
AT1G21890	UMAMIT19 (USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND OUT TRANSPORTERS 19)	-0.85	2E-04
AT5G39050	transferase/ transferase, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	-0.85	1E-04
AT3G45700	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-0.84	2E-04
AT3G26740	CCL (CCR-LIKE)	-0.84	1E-03
AT4G01430	nodulin MtN21 family protein	-0.84	1E-04
AT3G15440	unknown function	-0.84	3E-06
AT3G13450	BCDH (Branched-Chain alpha-Keto Acid Dehydrogenase E1 alpha subunit); DIN4 (DARK INDUCIBLE 4)	-0.84	1E-05
AT4G33150	LKR (LYSINE-KETOGLUTARATE REDUCTASE/SACCHAROPINE DEHYDROGENASE)	-0.84	3E-06
AT1G15330	CBS domain-containing protein	-0.83	1E-04
AT5G66400	RAB18 (RESPONSIVE TO ABA 18)	-0.82	1E-03
AT4G34030	MCCB (3-METHYLCROTONYL-COA CARBOXYLASE)	-0.81	1E-07

AT5G24580	copper-binding family protein	-0.81	4E-06
AT2G20670	unknown protein, DUF505	-0.81	2E-04
AT3G30775	PRODH (proline dehydrogenase), ERD5 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 5)	-0.81	1E-05
AT3G51240	F3H (FLAVANONE 3-HYDROXYLASE)	-0.80	3E-04
AT3G45300	IVD (ISOVALERYL-COA-DEHYDROGENASE)	-0.79	2E-04
AT1G67480	kelch repeat-containing F-box family protein	-0.79	2E-06
AT2G17880	DNAJ heat shock protein, putative	-0.79	1E-03
AT5G24080	protein kinase family protein	-0.78	5E-03
AT3G50400	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	-0.78	7E-03
AT1G12240	ATBETAFRUCT4; beta-fructofuranosidase	-0.78	6E-07
AT1G75770	unknown protein	-0.78	4E-04
AT1G08630	THA1 (THREONIN ALDOLASE1)	-0.78	5E-04
AT3G63470	scpl40 (serine carboxypeptidase-like 40)	-0.78	2E-06
AT1G01770	unknown protein, DUF1446	-0.77	4E-06
AT5G18670	BMY3 (Beta-Amylase3)	-0.77	8E-04
AT3G04070	ANAC 47 (NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 47)	-0.76	1E-02
AT3G23080	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	-0.76	5E-04
AT5G20250	RS6 (RAFFINOSE SYNTHASE6), DIN10 (DARK INDUCIBLE 10)	-0.76	7E-04
AT5G14180	MPL1 (MYZUS PERSICAE-INDUCED LIPASE 1)	-0.76	1E-03
AT2G02710	PLPB (PAS/LOV PROTEIN B)	-0.76	2E-04
AT5G13170	SAG29 (SENESCENCE-ASSOCIATED PROTEIN 29)	-0.75	4E-04
AT1G63180	UGE3 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 3)	-0.75	5E-04
AT2G13360	AGT1 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE1)	-0.75	2E-03
AT4G23590	Tyrosine Aminotransferase	-0.74	1E-03
AT4G38470	SERINE/THREONINE/TYROSINE KINASE 46, STY46	-0.74	8E-05
AT1G78290	SNRK2.8, SRK2C (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2-8)	-0.74	1E-03
AT2G22980	SCPL13 (serine-type carboxypeptidase 13)	-0.74	4E-04
AT5G14780	FDH (FORMATE DEHYDROGENASE)	-0.74	2E-03
AT4G16447	unknown protein	-0.73	1E-02
AT5G07440	GDH2 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2)	-0.73	1E-05
AT1G02205	CER1 (ECERIFERUM 1)	-0.72	3E-06
AT4G16190	Papain family cysteine protease	-0.72	3E-04
AT5G22920	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	-0.72	1E-03

AT2G05520	GRP-3 (GLYCINE-RICH PROTEIN 3)	-0.72	9E-04
AT4G39660	AGT2 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINO TRANSFERASE 2)	-0.72	2E-05
AT5G16370	AAE5 (ACYL ACTIVATING ENZYME 5)	-0.72	3E-05
AT5G54090	DNA mismatch repair MutS family protein	-0.71	1E-05
AT3G03700	Plasma-membrane choline transporter family protein, unknown function DUF580	-0.71	1E-04
AT3G16150	L-asparaginase, putative	-0.70	8E-04
AT1G10690	unknown protein	-0.70	2E-04
AT1G55510	BCDH BETA1 (BRANCHED-CHAIN ALPHA-KETO ACID DECARBOXYLASE E1 BETA SUBUNIT)	-0.70	4E-05

8.6 Originaldaten der Zuckermessung

Tabelle 8.6: **Zuckermessung in Wildtyp, *bzip1/bzip53*, *Ler* und *gin2*** Daten der Zuckermengen nach HPLC-Messung von verschieden lang salzgestresstem Wurzelmaterial (3, 6, 19 und 24h). Gezeigt sind die Mengen in nmol pro g Frischgewicht. Die Messung wurde von Markus Kruschke (Uni Würzburg) durchgeführt.

	WT 0 h	WT 3 h	WT 6 h	WT 19 h	WT 24 h
Glukose	975.93	986.51	1648.91	1205.65	1244.57
	1033.99	1017.48	1664.02	1103.67	1882.61
	961.95	910.45	1709.60	1391.64	905.31
Mittel	990.62	971.48	1674.18	1233.65	1344.16
SD	38.20	55.07	31.60	146.01	496.20
Fruktose	190.40	320.43	755.55	380.59	360.71
	227.85	na	711.84	311.51	812.05
	na	216.28	752.68	492.96	192.69
Mittel	209.12	268.36	740.02	395.02	455.15
SD	26.49	73.65	24.45	91.58	320.30
Saccharose	1307.44	1017.53	1753.22	1710.66	1021.66
	1145.95	1194.00	1774.97	1764.63	485.32
	1321.61	1209.23	1737.79	1624.14	1185.11
Mittel	1258.33	1140.25	1755.33	1699.81	897.36
SD	97.59	106.55	18.68	70.87	366.08
G-6-P	139.11	84.98	142.25	150.68	91.13
	153.98	95.03	140.57	155.65	89.67
	155.59	82.36	138.21	175.68	79.71
Mittel	149.56	87.45	140.34	160.67	86.84
SD	9.08	6.69	2.03	13.24	6.21
Raffinose	51.29	48.54	88.21	156.99	208.55

	66.78	54.31	89.13	147.20	232.10
	63.39	49.78	88.03	154.96	220.07
Mittel	60.49	50.88	88.46	153.05	220.24
SD	8.15	3.04	0.59	5.17	11.77
	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>
	0 h	3 h	6 h	19 h	24 h
Glukose	1584.38	1913.99	1457.24	2184.32	688.02
	1623.48	1626.53	1427.08	2012.11	714.01
	1804.85	1630.71	1579.12	2350.00	835.77
Mittel	1670.90	1723.74	1487.82	2182.15	745.93
SD	117.64	164.77	80.50	168.95	78.88
Fruktose	296.83	621.80	525.35	983.27	202.03
	na	509.77	na	866.57	216.01
	334.08	433.17	580.72	986.64	na
Mittel	315.46	521.58	553.03	945.50	209.02
SD	26.34	94.87	39.15	68.37	9.88
Saccharose	1608.86	2671.26	2882.90	2505.01	825.17
	1574.81	3049.81	3247.35	3078.80	793.70
	1626.25	2657.69	3073.87	2823.50	1023.30
Mittel	1603.31	2792.92	3068.04	2802.44	880.73
SD	26.16	222.57	182.30	287.47	124.47
G-6-P	192.24	236.90	114.96	170.07	41.85
	204.58	212.70	122.82	177.73	40.06
	230.95	221.69	148.23	182.13	48.78
Mittel	209.26	223.76	128.67	176.64	43.56
SD	19.77	12.23	17.39	6.10	4.61
Raffinose	37.59	75.96	119.81	119.25	86.59
	35.61	82.88	120.62	145.47	85.45
	37.72	80.92	118.12	144.29	105.40
Mittel	36.97	79.92	119.52	136.34	92.48
SD	1.19	3.57	1.27	14.81	11.20
	Ler 0 h	Ler 3 h	Ler 6 h	Ler 19 h	Ler 24 h
Glukose	814.96	2559.32	2614.83	1599.38	2639.03
	852.96	2754.10	5040.65	1421.57	2207.85
	903.39	2229.00	2666.81	1458.59	3127.35
Mittel	857.11	2514.14	3440.76	1493.18	2658.08
SD	44.36	265.45	1385.78	93.81	460.04
Fruktose	159.41	1021.01	1071.23	599.82	1215.23
	183.60	1102.85	851.74	485.36	1000.17
	183.05	867.09	1120.65	553.36	1530.10
Mittel	175.35	996.99	1014.54	546.18	1248.50
SD	13.81	119.70	143.14	57.57	266.53

Saccharose	1247.71	2723.63	3474.90	1712.82	4348.71
	1169.35	2990.55	1958.32	1760.61	3897.04
	1188.95	3215.16	3580.11	1901.90	6108.36
Mittel	1202.00	2976.45	3004.44	1791.78	4784.70
SD	40.78	246.07	907.49	98.32	1168.35
G-6-P	86.82	124.00	161.68	79.12	47.73
	88.13	132.37	151.29	75.63	47.26
	96.94	119.96	160.98	70.49	60.44
Mittel	90.63	125.44	157.99	75.08	51.81
SD	5.50	6.33	5.81	4.34	7.48
Raffinose	37.31	245.44	141.11	168.08	477.13
	37.85	255.94	51.22	149.57	391.23
	38.20	214.87	137.92	163.63	572.94
Mittel	37.79	238.75	110.08	160.43	480.43
SD	0.45	21.34	51.00	9.66	90.90
	<i>gin2</i> 0 h	<i>gin2</i> 3 h	<i>gin2</i> 6 h	<i>gin2</i> 19 h	<i>gin2</i> 24 h
Glukose	3884.88	3266.70	4547.05	2860.07	4435.81
		3007.87	4357.20	3165.31	3994.86
		2913.51	2186.99	3226.96	5985.41
Mittel	3884.88	3062.70	3697.08	3084.11	4805.36
SD	na	182.87	1311.22	196.46	1045.46
Fruktose	595.81	557.61	835.97	1387.31	2164.81
		568.04	850.79	1570.19	1833.89
		606.60	1066.83	1805.67	3366.08
Mittel	595.81	577.42	917.86	1587.73	2454.92
SD	na	25.81	129.22	209.73	806.24
Saccharose	2288.67	11913.02	2089.24	3425.28	2161.86
		2335.42	na	2836.03	2434.02
		2112.06	4484.32	4029.41	1264.21
Mittel	2288.67	2120.17	3286.78	3430.24	1953.36
SD	na	211.31	1693.58	596.70	612.14
G-6-P	232.95	134.50	84.41	69.43	75.50
		119.31	77.30	68.78	74.87
		124.52	81.11	60.89	77.11
Mittel	232.95	126.11	80.94	66.37	75.82
SD	na	7.72	3.56	4.75	1.16
Raffinose	27.26	34.65	38.63	172.18	395.87
		66.94	30.17	159.17	339.65
		56.00	85.92	242.01	833.93
Mittel	27.26	52.53	51.57	191.12	523.15
SD	na	16.42	30.05	44.55	270.61

8.7 Originaldaten der Aminosäuremessung

Tabelle 8.7: Aminosäure in Wildtyp, *bzip1/bzip53* und *bzip1/bzip53/bzip10/bzip25* Daten der Aminosäuremengen nach HPLC-Messung von verschieden lang salzgestresstem Wurzelmaterial (1, 3, 6 und 24h). Gezeigt sind die Mengen in nmol pro mg Frischgewicht. Die Messung wurde von Agnes Fekete mit Jasper Schierstaedt (Uni Würzburg) durchgeführt.

Name	WT 0 h	WT 1 h	WT 3 h	WT 6 h	WT 24 h
Asn	5.06	8.71	4.08	15.21	10.85
	4.40	7.81	5.99	13.19	12.51
	3.21	8.51	3.61	13.43	9.81
	2.88	7.25	4.92	14.87	14.62
	5.33	7.09	4.55		9.53
Mittel	4.18	7.87	4.63	14.17	11.46
SD	1.09	0.72	0.91	1.01	2.11
Arg	0.89	5.05	2.79	8.41	2.96
	1.90	2.22	3.52	6.81	6.02
	0.74	2.10	4.14	10.24	3.09
	0.49	2.58	3.52	4.76	5.44
	2.30	3.14	3.51		3.83
Mittel	1.26	3.02	3.50	7.56	4.27
SD	0.79	1.20	0.48	2.33	1.39
Gln	10.54	11.41	6.53	15.39	20.30
	7.95	8.20	9.18	19.09	16.67
	7.58	10.48	2.75	18.54	10.71
	7.51	7.64	7.96	21.48	18.28
	14.42	9.29	7.48		11.80
Mittel	9.60	9.40	6.78	18.62	15.55
SD	2.97	1.56	2.45	2.50	4.15
Ser	5.22	6.36	4.79	11.09	10.34
	6.14	6.71	5.57	7.93	8.83
	4.31	6.79	3.91	10.24	8.30
	4.00	4.73	4.24	9.50	10.33
	5.83	6.54	4.19		10.55
Mittel	5.10	6.23	4.54	9.69	9.67
SD	0.93	0.85	0.66	1.34	1.03
Gly	1.56	1.28	0.47	1.12	2.08
	2.27	2.03	0.59	1.19	2.11
	1.50	1.46	0.57	0.88	1.63
	1.28	1.05	0.48	2.23	2.13
	2.06	1.64	0.66		3.96
Mittel	1.74	1.49	0.56	1.36	2.38
SD	0.42	0.37	0.08	0.60	0.91

Asp	9.23	18.11	4.99	15.30	15.66
	7.81	19.43	8.97	15.64	10.24
	7.33	20.97	4.27	14.68	9.64
	8.57	13.24	11.28	15.84	15.12
	9.99	13.76	7.01		11.04
Mittel	8.58	17.10	7.31	15.36	12.34
SD	1.07	3.45	2.88	0.51	2.84
Glu	27.17	38.01	19.05	50.45	45.04
	19.74	28.26	28.39	41.32	29.77
	20.12	35.66	13.65	51.32	22.36
	23.11	26.18	29.83	47.00	39.96
	28.14	24.99	20.81		21.31
Mittel	23.66	30.62	22.35	47.52	31.69
SD	3.89	5.85	6.74	4.53	10.55
Thr	4.84	9.30	3.65	13.64	6.34
	4.19	6.58	5.97	8.69	10.02
	3.48	8.21	3.46	9.63	6.48
	3.21	6.45	5.07	10.39	10.29
	5.26	7.04	5.46		6.76
Mittel	4.20	7.52	4.72	10.59	7.98
SD	0.87	1.22	1.11	2.15	2.00
Ala	3.53	3.66	1.32	8.88	7.74
	3.01	3.51	1.70	6.47	3.91
	2.06	2.87	0.64	5.79	3.55
	2.62	1.83	1.87	7.19	8.05
	4.36	2.42	2.36		4.76
Mittel	3.12	2.86	1.58	7.08	5.60
SD	0.88	0.76	0.65	1.33	2.14
Pro	3.35	6.46	0.91	7.94	2.95
	1.80	2.38	4.87	14.50	9.58
	1.75	3.52	1.10	7.33	7.44
	1.67	2.92	4.11	16.45	4.19
	4.39	4.43	2.01		3.59
Mittel	2.59	3.94	2.60	11.55	5.55
SD	1.22	1.60	1.80	4.60	2.84
GSH	6.17	12.09	5.45	12.53	9.05
	5.39	6.71	5.72	8.46	11.79
	5.49	8.41	4.30	15.39	7.41
	6.22	8.60	6.84	10.12	12.24
	9.67	8.74	5.71		6.92
Mittel	6.59	8.91	5.61	11.62	9.48
SD	1.76	1.96	0.91	3.02	2.45

Lys	1.18	4.78	1.71	6.07	2.79
	1.93	2.44	3.99	4.10	4.95
	0.64	2.83	2.04	9.58	4.03
	1.09	2.44	3.58	3.92	5.41
	1.69	2.43	2.95		3.66
Mittel	1.31	2.98	2.86	5.92	4.17
SD	0.51	1.02	0.98	2.63	1.04
Tyr	0.42	1.09	0.47	1.90	0.69
	0.86	1.18	1.33	1.73	1.68
	0.49	0.98	0.98	2.08	1.34
	0.34	0.94	0.96	1.43	1.63
	0.87	0.96	1.00		1.90
Mittel	0.60	1.03	0.95	1.78	1.45
SD	0.25	0.10	0.31	0.28	0.47
Val	1.31	5.80	1.29	9.83	3.42
	1.90	3.00	3.44	4.25	5.21
	1.11	2.85	2.30	5.57	3.87
	1.03	2.51	2.69	4.13	6.55
	2.24	2.79	2.73		4.37
Mittel	1.52	3.39	2.49	5.95	4.69
SD	0.53	1.36	0.79	2.67	1.24
Nor	1.37	3.93	1.37	6.51	2.64
	1.61	1.64	1.64	1.62	1.62
	2.15	2.16	2.15	2.14	2.15
	1.62	1.61	1.61	1.62	1.62
	1.63	1.61	1.64		1.63
Mittel	1.68	2.19	1.68	2.97	1.93
SD	0.29	1.00	0.28	2.37	0.46
Cys	0.35	0.68	0.33	0.69	0.34
	0.44	0.68	0.45	0.71	1.00
	0.48	0.81	0.47	0.91	0.68
	0.43	0.90	0.58	0.98	1.05
	0.81	0.96	0.74		0.75
Mittel	0.50	0.80	0.52	0.82	0.76
SD	0.18	0.13	0.15	0.15	0.29
Ile	0.56	2.07	0.64	3.73	1.05
	0.91	1.51	2.00	2.09	3.06
	0.51	1.36	1.08	3.45	2.14
	1.17	1.35	1.62	2.13	3.40
	1.07	1.42	1.49		2.47
Mittel	0.84	1.54	1.37	2.85	2.43
SD	0.30	0.30	0.52	0.86	0.91

Leu	0.88	3.17	0.79	5.14	1.75
	1.41	2.45	3.29	2.81	2.74
	0.78	2.20	1.03	4.95	2.52
	0.70	2.04	2.53	3.10	3.64
	1.38	2.30	2.32		3.16
Mittel	1.03	2.43	1.99	4.00	2.76
SD	0.34	0.44	1.05	1.21	0.71
Phe	0.36	1.01	0.72	1.87	0.65
	0.70	0.97	1.39	2.94	1.14
	0.45	0.88	1.50	2.28	1.49
	0.35	0.94	1.03	1.28	1.93
	0.83	0.89	1.10		2.96
Mittel	0.54	0.94	1.15	2.09	1.63
SD	0.22	0.05	0.31	0.70	0.88
	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>	<i>bzip1/bzip53</i>
	0 h	1 h	3 h	6 h	24 h
Asn	2.76	4.18	4.49	16.76	20.26
	5.15	4.55	3.72	27.47	11.66
	4.51	6.97	4.69	18.52	6.85
	5.30	7.04	7.08	14.67	13.17
	2.72	4.63	4.48	8.48	12.51
Mittel	4.09	5.47	4.89	17.18	12.89
SD	1.27	1.41	1.28	6.89	4.81
Arg	1.10	1.63	1.44	9.24	10.20
	2.86	3.01	0.80	8.76	3.48
	4.15	3.16	1.13	12.04	2.96
	5.42	4.13	4.55	7.44	5.26
	1.59	2.72	3.57	5.85	6.68
Mittel	3.02	2.93	2.30	8.67	5.72
SD	1.79	0.90	1.66	2.30	2.91
Gln	7.22	7.23	12.00	29.42	14.43
	7.99	8.52	5.15	37.15	12.69
	9.59	11.45	6.86	32.18	9.18
	8.44	7.70	8.12	17.58	12.98
	7.67	8.16	9.08	12.53	9.67
Mittel	8.18	8.61	8.24	25.77	11.79
SD	0.91	1.66	2.57	10.32	2.27
Ser	3.27	4.81	2.98	12.10	8.95
	4.68	5.94	2.86	11.95	9.55
	4.98	6.21	5.27	15.46	5.60
	4.77	5.39	5.40	10.40	7.68
	5.97	4.80	5.04	6.33	9.55

Mittel	4.74	5.43	4.31	11.25	8.27
SD	0.97	0.64	1.28	3.31	1.67
Gly	0.98	0.93	1.28	1.14	1.83
	1.36	1.26	0.56	1.45	1.44
	1.42	1.00	1.03	1.35	1.43
	1.15	0.87	0.56	1.08	1.26
	2.21	0.89	0.66	1.03	3.54
Mittel	1.42	0.99	0.82	1.21	1.90
SD	0.47	0.16	0.32	0.18	0.94
Asp	6.50	19.07	7.31	17.99	10.44
	6.87	15.64	6.39	12.55	9.21
	8.38	18.46	11.23	18.93	7.19
	8.20	14.61	10.50	18.78	10.88
	6.68	13.84	10.41	15.60	8.82
Mittel	7.33	16.32	9.17	16.77	9.31
SD	0.89	2.33	2.17	2.71	1.46
Glu	17.00	36.82	17.94	58.54	26.40
	20.04	31.43	13.84	31.08	29.12
	21.82	38.49	30.02	55.50	21.15
	22.97	27.95	24.64	50.50	27.13
	17.17	23.43	22.34	43.90	19.91
Mittel	19.80	31.62	21.76	47.91	24.74
SD	2.69	6.22	6.21	10.91	3.99
Thr	3.70	5.69	3.84	14.04	12.84
	5.16	5.74	3.77	16.39	7.55
	4.75	6.73	4.56	14.67	5.43
	5.13	6.05	7.70	11.21	9.33
	3.57	6.62	6.66	8.07	7.82
Mittel	4.46	6.17	5.31	12.88	8.60
SD	0.77	0.48	1.78	3.27	2.75
Ala	1.93	2.71	2.33	6.69	2.83
	3.11	2.34	1.03	10.02	7.27
	2.37	2.60	2.40	9.94	2.69
	2.82	1.98	1.79	5.04	3.69
	2.34	1.93	1.69	2.74	3.97
Mittel	2.52	2.31	1.85	6.89	4.09
SD	0.46	0.35	0.55	3.15	1.86
Pro	2.08	3.85	2.64	36.51	6.85
	2.30	2.97	3.93	23.48	10.94
	1.98	3.98	2.82	34.01	2.90
	2.09	2.52	2.67	8.76	7.53
	1.18	2.01	3.03	4.18	4.98

Mittel	1.93	3.07	3.02	21.39	6.64
SD	0.43	0.85	0.53	14.56	3.00
GSH	5.25	9.47	3.23	10.06	10.82
	6.90	8.39	2.97	8.62	7.57
	7.64	9.18	5.38	12.94	5.16
	8.21	8.80	6.61	15.76	8.13
	5.54	7.73	6.39	9.97	6.93
Mittel	6.71	8.71	4.92	11.47	7.72
SD	1.29	0.68	1.72	2.87	2.06
Lys	1.39	2.45	1.73	4.05	10.08
	2.56	3.23	1.40	3.09	3.94
	3.17	2.85	1.93	6.47	3.98
	2.85	2.80	4.41	6.26	5.25
	1.44	2.18	3.08	4.66	5.42
Mittel	2.28	2.70	2.51	4.91	5.73
SD	0.82	0.40	1.24	1.45	2.53
Tyr	0.36	0.68	0.43	1.33	2.62
	0.72	1.12	0.57	1.70	1.37
	0.80	0.92	0.75	2.27	1.62
	0.80	0.98	1.15	2.21	1.58
	0.60	0.74	1.16	1.92	2.55
Mittel	0.66	0.89	0.81	1.89	1.95
SD	0.19	0.18	0.34	0.39	0.59
Val	1.09	2.68	2.67	5.82	16.77
	2.29	2.57	1.53	5.52	4.96
	1.64	2.73	1.94	7.08	4.04
	2.82	3.41	4.29	7.04	6.40
	1.31	2.57	3.48	4.89	6.95
Mittel	1.83	2.79	2.78	6.07	7.82
SD	0.72	0.35	1.12	0.96	5.13
Nor	1.25	2.23	2.03	4.23	10.61
	1.62	1.62	1.63	1.63	1.61
	2.17	2.16	2.17	2.15	2.16
	1.63	1.62	1.62	1.62	1.61
	1.62	1.62	1.62	1.63	1.64
Mittel	1.66	1.85	1.81	2.25	3.52
SD	0.33	0.32	0.27	1.13	3.97
Cys	0.37	0.57	0.24	0.57	0.86
	0.58	0.66	0.36	0.89	0.66
	0.73	0.90	0.65	0.87	0.74
	0.74	0.79	0.75	1.09	1.00
	0.46	0.94	0.82	0.93	1.16

Mittel	0.58	0.77	0.56	0.87	0.88
SD	0.16	0.16	0.25	0.19	0.20
Ile	0.55	1.11	0.98	2.24	6.46
	1.11	1.31	0.80	2.34	2.97
	0.69	1.24	0.98	3.81	2.58
	1.22	1.49	2.40	4.26	3.72
	0.60	1.32	1.94	2.93	4.62
Mittel	0.83	1.29	1.42	3.12	4.07
SD	0.31	0.14	0.71	0.89	1.55
Leu	0.91	1.82	1.13	3.41	6.26
	1.66	2.22	1.19	2.88	3.58
	1.11	2.07	1.58	4.28	3.37
	1.24	2.16	3.14	6.91	3.91
	0.92	2.13	3.05	4.79	5.26
Mittel	1.17	2.08	2.02	4.45	4.47
SD	0.31	0.15	1.00	1.56	1.24
Phe	0.40	0.68	1.18	1.18	3.18
	0.49	1.01	0.63	1.34	1.34
	1.19	1.09	0.87	1.96	1.43
	2.42	2.26	1.30	2.68	1.26
	0.52	0.87	1.46	1.70	2.23
Mittel	1.01	1.18	1.09	1.77	1.89
SD	0.85	0.62	0.33	0.59	0.82
	<i>1/53/10/25</i>	<i>1/53/10/25</i>	<i>1/53/10/25</i>	<i>1/53/10/25</i>	<i>1/53/10/25</i>
	0h	1h	3h	6h	24h
Asn	8.53	12.30	8.59	10.24	14.19
	4.59	17.92	10.59	10.66	17.70
	7.51	8.82	7.81	12.35	7.80
	7.94	8.78	6.75	12.83	24.22
	3.86	6.37	7.38	7.37	12.32
Mittel	6.49	10.84	8.22	10.69	15.25
SD	2.11	4.49	1.48	2.15	6.16
Arg	7.11	4.70	5.50	12.20	3.96
	1.45	5.40	7.16	5.88	7.63
	2.83	4.13	5.18	5.52	3.23
	2.80	5.18	2.98	6.51	12.46
	1.62	4.17	2.46	6.11	6.48
Mittel	3.16	4.72	4.66	7.25	6.75
SD	2.30	0.58	1.93	2.80	3.66
Gln	22.98	22.95	15.71	16.74	14.54
	14.18	38.67	17.22	14.16	10.55
	20.75	15.72	13.99	17.70	8.34
	19.65	15.85	10.56	14.82	16.15

	13.57	13.98	12.59	11.44	13.78
Mittel	18.23	21.43	14.01	14.97	12.67
SD	4.15	10.23	2.61	2.43	3.17
Ser	9.00	8.76	7.16	8.05	9.69
	4.56	9.31	7.45	7.34	7.34
	6.97	7.12	6.70	10.68	5.96
	5.72	7.16	5.34	9.22	10.36
	4.11	6.66	5.12	6.49	7.85
Mittel	6.07	7.80	6.35	8.36	8.24
SD	1.98	1.16	1.06	1.64	1.79
Gly	2.46	1.48	0.83	1.01	1.51
	1.56	1.62	0.91	0.90	1.39
	1.39	1.57	0.71	1.09	1.86
	1.11	1.36	0.66	0.85	2.13
	0.93	1.43	0.73	0.87	1.90
Mittel	1.49	1.49	0.77	0.94	1.76
SD	0.59	0.11	0.10	0.10	0.30
Asp	9.49	14.63	15.48	16.62	12.39
	7.33	10.54	13.15	14.80	7.54
	10.35	14.52	14.94	22.67	7.97
	11.75	14.37	11.31	19.90	13.92
	7.61	14.65	12.28	9.66	11.31
Mittel	9.31	13.74	13.43	16.73	10.63
SD	1.86	1.79	1.76	4.98	2.79
Glu	26.44	45.70	32.62	45.71	33.25
	20.35	35.56	29.61	38.10	16.16
	29.09	30.90	30.35	62.26	15.77
	31.26	35.92	24.49	48.32	23.86
	19.55	31.58	25.09	35.08	22.93
Mittel	25.34	35.93	28.43	45.89	22.39
SD	5.21	5.91	3.51	10.62	7.12
Thr	9.79	10.58	9.60	9.24	9.47
	5.36	15.30	9.90	8.12	9.42
	8.97	9.15	8.83	11.14	6.18
	9.09	8.23	7.48	10.83	13.74
	4.82	7.53	8.42	7.50	7.84
Mittel	7.61	10.16	8.85	9.37	9.33
SD	2.33	3.09	0.96	1.61	2.81
Ala	4.66	6.59	2.53	4.63	4.62
	2.35	9.40	2.35	3.28	1.70
	3.33	3.01	2.13	5.97	2.83
	3.57	3.86	1.57	3.48	2.77

	1.96	3.22	1.87	3.18	3.57
Mittel	3.17	5.22	2.09	4.11	3.10
SD	1.06	2.74	0.38	1.19	1.08
Pro	23.40	24.05	8.35	12.62	7.14
	7.86	27.20	8.36	8.83	7.98
	8.56	5.43	5.63	9.10	6.11
	22.95	18.63	6.10	8.02	10.82
	1.72	11.98	8.12	8.79	7.45
Mittel	12.90	17.46	7.31	9.47	7.90
SD	9.75	8.86	1.34	1.80	1.77
GSH	7.19	10.02	7.76	10.87	10.49
	6.50	8.42	7.18	8.46	6.93
	11.12	8.69	5.91	12.28	3.98
	11.02	10.69	6.75	12.64	12.91
	7.34	10.16	8.27	10.34	7.92
Mittel	8.63	9.60	7.17	10.92	8.45
SD	2.25	0.99	0.91	1.67	3.41
Lys	2.73	4.05	4.87	4.97	4.37
	1.49	2.68	5.82	5.36	7.83
	2.41	4.07	5.94	6.76	5.02
	1.97	4.08	3.13	5.80	11.01
	1.15	2.93	1.80	4.02	4.89
Mittel	1.95	3.56	4.31	5.38	6.62
SD	0.65	0.70	1.80	1.01	2.80
Tyr	0.81	1.05	1.37	1.19	1.45
	0.38	0.96	1.91	2.24	2.65
	0.72	1.34	1.30	2.00	1.45
	0.43	1.18	0.72	2.07	3.21
	0.38	1.26	0.64	1.84	1.94
Mittel	0.54	1.16	1.19	1.87	2.14
SD	0.21	0.15	0.52	0.40	0.77
Val	3.37	5.58	6.87	5.96	7.71
	1.61	3.57	5.78	5.36	8.69
	2.73	3.53	4.51	5.78	4.09
	2.49	3.74	3.14	6.39	11.83
	1.67	3.09	2.39	4.82	5.86
Mittel	2.37	3.90	4.54	5.66	7.64
SD	0.74	0.97	1.84	0.60	2.93
Nor	2.55	3.81	4.67	4.04	5.16
	1.61	1.62	1.63	1.62	1.62
	2.18	2.16	2.17	2.18	2.17
	1.62	1.62	1.61	1.63	1.63

	1.61	1.63	1.63	1.62	1.62
Mittel	1.91	2.17	2.34	2.22	2.44
SD	0.43	0.94	1.32	1.05	1.54
Cys	0.45	0.61	0.61	0.54	0.75
	0.41	0.92	0.85	0.66	0.90
	0.99	0.97	0.70	0.91	0.73
	0.82	0.92	0.73	0.98	1.83
	0.63	1.00	0.89	0.93	0.97
Mittel	0.66	0.88	0.76	0.80	1.03
SD	0.25	0.16	0.11	0.19	0.45
Ile	1.31	2.00	2.74	2.37	3.14
	0.73	1.51	3.46	3.41	5.92
	1.24	1.91	2.64	3.45	2.65
	1.07	2.03	1.69	4.07	7.89
	0.71	1.76	1.24	2.90	3.76
Mittel	1.01	1.84	2.36	3.24	4.67
SD	0.28	0.21	0.89	0.64	2.19
Leu	1.60	3.23	4.26	3.68	3.78
	0.95	2.48	5.12	5.41	6.96
	1.65	3.23	4.13	5.64	3.31
	1.59	3.19	2.53	6.40	9.28
	0.99	3.04	1.88	4.23	4.98
Mittel	1.36	3.03	3.58	5.07	5.66
SD	0.35	0.32	1.33	1.10	2.47
Phe	0.62	0.90	1.53	1.36	0.93
	0.38	0.66	2.01	2.19	1.87
	0.62	1.34	1.42	2.08	1.11
	0.43	1.29	1.10	2.26	2.39
	0.41	1.35	1.00	1.64	1.58
Mittel	0.49	1.11	1.41	1.91	1.57
SD	0.12	0.31	0.40	0.39	0.59

8.8 Promotorsequenz von BCAT2

bZIP-Transkriptionsfaktoren binden an ACGT-Elemente in den Promotorregionen der Zielgene. Die Bindung kann mittels CHIP nachgewiesen werden. Hier sind die ersten 1500 bp des Promotors von BCAT2-Promotors gezeigt, die ACGT-Elemente sind rot markiert.

```

1 CACAGCAACT TCGATCTATT CTTGTCGGAA TACAAACGTG TTCTATCCAA GACTACTAAAG
61 ATTGGGTTTT GCAGATTGCC TAAGTTACTT TCATATCCTA TAAATAATGT TGCACCTCTCT
121 TGATCACCCA TCAAAAGCTT TTGAAATAGT TTTTGGTAAA TTTGTGACAT AAATTTGTGA
181 TATATCACCA CATCGTATTA GTATTAACA TTTGTTTTCAC TCTTCCAAAG AGACAAAAGC
241 AAAACTAAAG ACCTTCAACT TCAAGTTCAG GATATGTAAT CTAATGGTTT GTCTTTGTGG
301 CATTTTGCCA CCATTGGTTC AAAATACCAT TGCTGTATGA TCAGCCTCCT CAGATTCTAT
361 TTGCCAGACT CTACGGCGGT ATATTCGCTT TTAGAAAAAA AACAAATTTG TCGAAACTTT
421 TTTTTTTTTG TAAATATTGT AGATTCCACA CACAAGACGT TCTAAGATTC TTTGATAAGA
481 CACGACAAAT GCGATTTAAG ATTTTTCAAA GAAATGAGGT TCGTTGATTG TTCCACTAGG
541 TTTGGTATAT TTATAATTTG AATTTTTTTT TTTAAAGATA TTTATAAGAA AACGAAGGAG
601 TGTGCTCGCG TCAAGTGTGT ACTAATAGTC GATGACACTA GTGATACGAC GATACGTGAA
661 AGGGACATCA ATATTCATTA GTAAGCCATC TTAGCAAAAA CGTTGTTATC AGATAAGAAA
721 AGTTCTCAGA CGTACGTGGC TGTCAATCTC CACAACGTGT TTATCTCCCA TTTGGGTAGT
781 TACGGACAAA GACGTTGAAA AGACAACAAT ATGGTCTAAA AGATTGACAT GGAAAGAAAA
841 TTGTTTATCC GACAAAGACC TCTTGGTCCA ACGTGGCTTT CACATCACTA GTTTACTATT
901 TCACATCTCA TGGAAAATTA CGTAAATTAG TACTTGTCTG TATTTTGTTC TTTTCGTCAAG
961 TATTTGTTTG TATACTTTAG GTAATTGCGT GCCGAAGAAA CATTGCTAAA TTGATATTTA
1021 TACCAACTTA CAATAGTTTA CAGTTCAAAA ATAGAAATCT CCATTTTGAA GATACACCAC
1081 TAATTTTCTT CATTATTTA CCCATAAGA GAACGAGAAA AGAACAATAG TCCGTTGATT
1141 TCGTTAAAAT CTAGTTTCAG AAAGACACGT CTAGATCTGT CTGATCAGGG CAGATAGACA
1201 CAAGTGACGA AGCAAAAAGAA ACACAAAAT AAGATAAGAA CTCTTACCAC TAAAAGATAA
1261 AAATAAGAAA AAAAAATAAAA CAAATTCAAC GATTTGCCAA GATAAAAAGCA GACACGTTAC
1321 ATAAGCTCCG CATTCACTTA CGTGTGGAT ACTTAATTTG ACACTCTTCT TTGTGTTTTC
1381 TCTTCCACCT TCTTTTTCGG TATATCATTC AACAAAATTC TCTCTCATT TCTTTATTTT
1441 GTTGTTTTTT TTATTATTAT TGAAATCAAG AGAATTAATA CAGAGGCTCT GCAAAAGAAG
1501 ATG

```

8.9 Metabolite des Citratzyklus in Wildtyp und *bzip1/bzip53* nach Salzstress

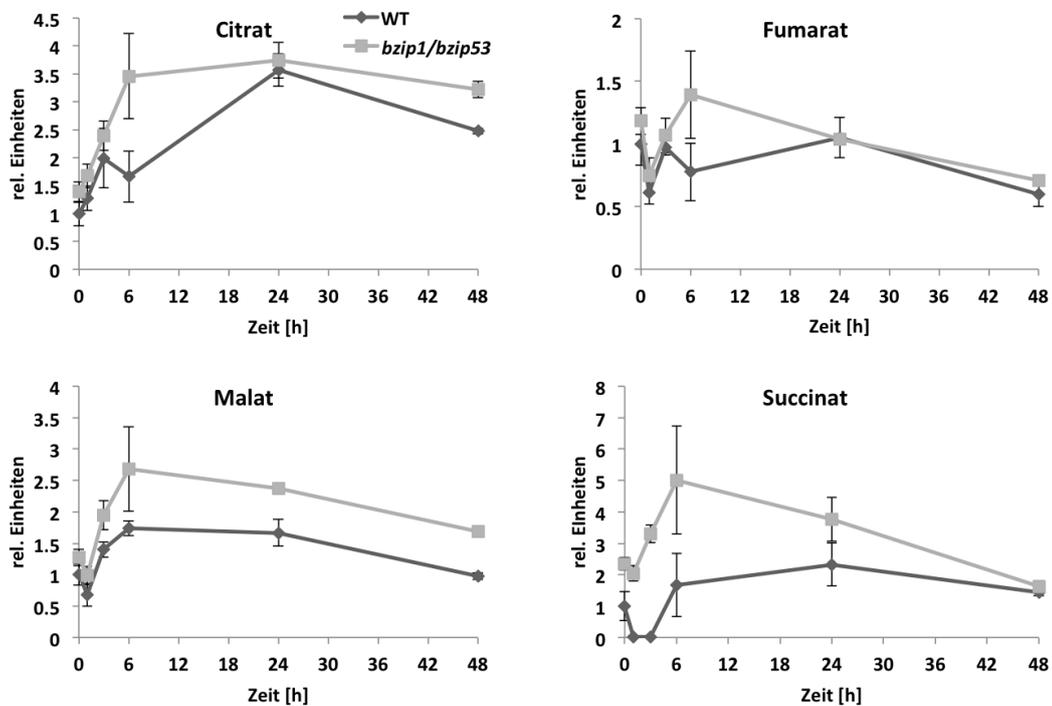


Abbildung 8.5: Messung des Metabolite des Citratzyklus nach Salzstress in Wurzeln von Wildtyp, und *bzip1/bzip53*: Wildtyp und *bzip1/bzip53* wurden sechs Wochen unter Kurztagbedingungen in Hydroponik angezogen. Die Pflanzen wurden unterschiedlich lange (1 h, 6 h, 24 h) mit 150 mM NaCl behandelt und zum selben Zeitpunkt (0h) geerntet. Mit Hilfe von GC-MS wurde die Menge der Metabolite gemessen (Stefan Kempa, MPI Gollm). Dargestellt sind die relativen Mengen im Vergleich zum unbehandelten Material. (n=3-4, Fehler: SE)

8.10 Interaktion von bZIP1 und bZIPs der Gruppe A in Protoplasten

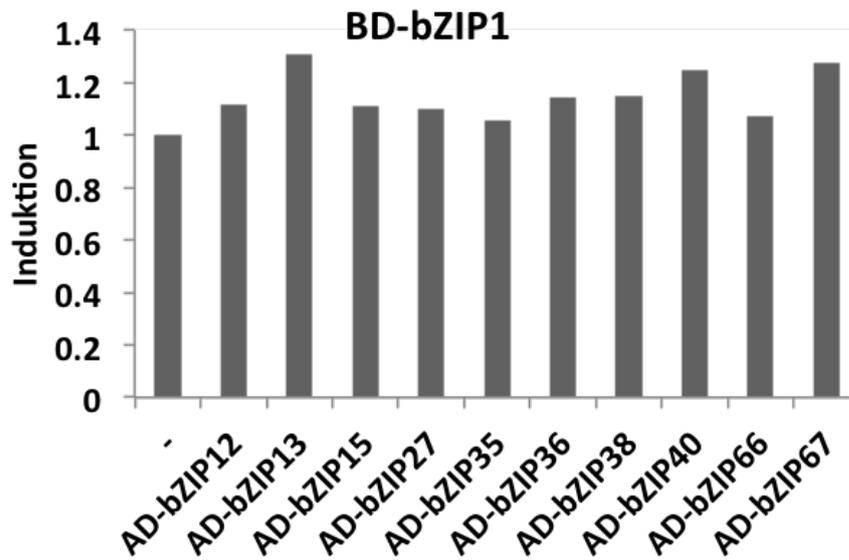


Abbildung 8.6: **Interaktion von BD-bZIP1 und AD-bZIPs der Gruppe A in Protoplasten:** Blattmesophyll-Protoplasten wurden mittels PTS-System transformiert (Wehner et al., 2011). Gezeigt ist die relative Induktion des Gal4:UAS:LUC-Reporterkonstrukts durch BD-bZIP1 in Kombination mit den den bZIP-Transkriptionsfaktoren der Gruppe A im AD-Expressionsvektor.

9 Abkürzungsverzeichnis

9.1 Allgemeine Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
ABA2	ABA DEFICIENT 2
ABI1	ABA INSENSITIVE 1
ABRE	ABA responsives Element
AHK1	ARABIDOPSIS HISTIDIN KINASE 1
Amp	Ampicillin
AMPK	AMP- ACTIVATED PROTEIN KINASE
APS	Ammoniumpersulfat
AREB1	ABA RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING PROTEIN 1
ASN1	GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1
AtANN1	ANNEXIN 1
AtbZIP	<i>Arabidopsis thaliana</i> basischer Leucinzipper
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCAT2	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2
bZIP	basischer Leucinzipper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ca ₂ (NO ₃) ₂	Calciumnitrat
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Cl ⁻	Chlorid-Ionen
Col-0	Columbia
Ct	Threshold-Cycle
CuSO ₄	Kupfersulfat
DEPC	Diethyldicarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DREB	DROUGHT-RESPONSIVE ELEMENT BINDING

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERF	ETHYLEN RESPONSE BINDING
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EtOH	EtOH
FBP	FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GIN2	GLUCOSE INSENSITIVE 2
GUS	β -Glucuronidase
H ₂ O	Wasser
H ₃ BO ₃	Borsäure
HAB1	HYPERSENSITIVE TO ABA1
HAI1	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HCl	Salzsäure
HGO	HOMOGENISATE 1,2-DIOXYGENASE
HXK1	HEXOKINASE1
IPP	ISOPENTYL DIPHOSPHATE
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KIN	SnRK1-Kinase
KNO ₃	Kaliumnitrat
LaCl ₃	Lanthanclorid
LB	Luria-Bertani Broth
LEA	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT
Ler	Landsberg erecta
Lsg	Lösung
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MCCA	METHYLCROTONYL-COA-CARBOXYLASE
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGL	METHIONIN-GAMMA-LYASE
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnSO ₄	Mangan(II)-sulfat
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Murashige und Skoog Medium
Na ⁺	Natrium-Ionen
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

NCED3	9- <i>cis</i> -EPOXYCORITENIOD DIOXYGENASE 3
NTC	non template control
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	1,4-Piperazin-bis-(ethansulfonsäure)
PP2C	PROTEIN PHOSPHATASE 2C
PPDK	PYRUVAT ORTHOPHOSPHAT DIKINASE
Pro35S	35S-Promotor aus Cauliflower Mosaic Virus
PRODH1	PROLINE DEHYDROGENASE 1
PVDF	Polyvinylendifluorid
PYL	PYRBACTIN RESISTANCE-LIKE
PYR	PYRBACTIN RESISTANCE
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RCAR	REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR
RD29A	RESPONSIVE TO DESSICATION 29A
RNA	Ribonukleinaäure
RNase	Ribonuclease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SIRT	Saccharose induzierte Repression der Translation
SuRK	SUCROSE NON FERMENTING RELATED KINASE 2
SUS4	SUCROSE SYNTHASE 4
SOS	<i>salt oerly sensitive</i>
TAT7	TYROSINE AMINOTRANSFERASE 7
Taq	Thermus aquaticus (DNA-Polymerase aus T. aquaticus)
TBE	Tris-Borat-EDT A-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
UBQ5	UBIQUITIN 5
uORFs	upstream open reading frames
UTR	untranslatierte Region
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
W-7	N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZnSO ₄	Zinksulfat

9.2 Einheiten

°C	Grad Celsius
A	Ampere
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
M	Molar
min	Minute
s	Sekunde
U	Unit (definierte Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt
W	Watt

9.3 Präfixe

k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})

9.4 Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

9.5 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Erklärungen

gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Darüber hinaus habe ich bisher keine akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Würzburg, 01.04.2014

Laura Hartmann

