

**Identifizierung und Charakterisierung von
Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Antwort auf
das Oxylin 9-Hydroxyoktadekatriensäure (9-HOT)**



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

vorgelegt von

Elisabeth Walper

geb. Schwarz

geboren in Bayreuth

Würzburg, 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Zweitgutachter: PD Dr. Dirk Becker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am

Für meine Familie

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig. Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe,
Italienische Reise, Caserta, den 16. März 1787

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Oxylipine: Signalmoleküle in Mensch und Tier	8
1.2	Oxylipine: Signalmoleküle in Pflanzen	10
1.2.1	Bildung von Oxylipinen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
1.2.2	Funktion von C ₁₃ -Oxylipinen	14
1.2.3	Die Rolle der C ₉ -Oxylipine in der pflanzlichen Stressantwort und Entwicklung	15
1.3	Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Stressantwort	17
1.3.1	Pflanzliche Transkriptionsfaktoren	17
1.3.2	Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Genexpression bei Überflutung	20
1.3.3	Transkriptionsfaktoren in Oxylipin-vermittelten Antworten	21
1.3.4	Identifikation von Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Stressantwort	22
1.4	Zielsetzung	23
2	MATERIAL	26
2.1	Organismen	26
2.1.1	Bakterien	26
2.1.2	Pflanzen	26
2.2	Nukleinsäuren	27
2.2.1	Plasmide	27
2.2.2	Oligonukleotide	27
2.3	Nährmedien	28
2.3.1	Medium für Bakterien	28
2.3.2	Medium für Pflanzen	29
2.3.3	Zusätze	29
2.4	Chemikalien	29
2.5	Enzyme, Kits und Größenstandards	30
2.5.1	Enzyme	30
2.5.2	Kits	30
2.5.3	Größenstandards	31
2.6	Antikörper	31
2.7	Puffer und Lösungen	31
2.8	Laborgeräte	32
2.9	Verbrauchsmaterialien	33
2.10	Verwendete Computerprogramme und Internetdienste	33

3	METHODEN.....	34
3.1	Pflanzen-Anzucht.....	34
3.1.1	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Samen.....	34
3.1.2	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
3.1.3	Die AtTORF-Ex-Kollektion, eine Sammlung von TF-Überexpressionslinien	34
3.1.4	Oxylipin-Stress	35
3.1.5	Überflutungs-Stress	35
3.1.6	Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformation	36
3.1.7	Selektion transgener Pflanzen auf Basta®-Resistenz.....	36
3.1.8	Selektion transgener Pflanzen auf Hygromycin-Resistenz.....	37
3.1.9	Kreuzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	37
3.1.10	Induktion der Expression durch β -Estradiol.....	37
3.1.11	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000.....	37
3.2	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion	38
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	39
3.2.4	Isolation von Plasmid-DNA	39
3.2.5	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	39
3.2.6	Gateway™ –Klonierung.....	40
3.2.7	Transformation von Bakterien.....	41
3.2.8	Kolonie PCR.....	41
3.2.9	Herstellung von Glycerin-Stocks	42
3.2.10	Extraktion genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.2.11	Sequenzierung von DNA	42
3.2.12	Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial	43
3.2.13	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	43
3.2.14	DNase-Verdau, Fällung der RNA, cDNA-Synthese.....	44
3.2.15	Quantitative real-time PCR	44
3.2.16	RNAseq-Transkriptom-Analyse	45
3.3	Proteinbiochemische Methoden	45
3.3.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	45
3.3.2	SDS-PAGE.....	46
3.3.3	Proteintransfer mittels Semi-Dry-Blot	46
3.3.4	Immunodetektion	46
3.4	Statistische Auswertung	47
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Screening der <i>Arabidopsis thaliana</i> Transkriptionsfaktor- Überexpressionssamen-bank auf erhöhte Resistenz gegenüber dem Oxylipin 9-HOT	48
4.1.1	<i>Proof-of-Principle</i> : Überexpression von TF verbessert das Wurzelwachstum auf 9-HOT	48
4.1.2	Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion hinsichtlich Wurzelwachstums auf dem Oxylipin 9-HOT 50	
4.2	Untersuchung der Funktion von ERF106 und ERF107 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
4.2.1	Analyse des Wurzelwachstums von ERF106 bzw. ERF107 Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten auf verschiedenen Xenobiotika	59
4.2.2	Analyse der differentiell exprimierten Gene in <i>erf106</i> und <i>erf107</i> Funktionsverlust-Mutanten	60
4.2.3	Analyse der differentiell exprimierten Gene in ERF106 und ERF107 Funktionsgewinn-Mutanten.....	63

4.3	Untersuchung weiterer Funktionen von ERF106 und ERF107 unter natürlichen Bedingungen	69
4.3.1	Analyse der Genexpression von <i>ERF106</i> bzw. <i>ERF107</i> abhängig von Stress-bedingungen.....	69
4.3.2	Analyse der differentiell exprimierten Gene in Funktionsverlust-Mutanten von <i>erf106</i> und <i>erf107</i> nach Überflutung.....	73
4.3.3	Ermittlung der Überlebensrate von <i>erf106</i> und <i>erf107</i> Funktionsverlust-Mutanten nach Überflutung 75	
5	DISKUSSION	77
5.1	Der Transkriptionsfaktor TGA5 und das TGA-Zielgen <i>CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASE CYP81D11</i> ermöglichen besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT	77
5.2	Die Überexpression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren kompensiert die Wurzelwachstums-hemmende Wirkung des Oxylin 9-HOT.....	78
5.3	Der Funktionsverlust von Gruppe S-bZIP-Transkriptionsfaktoren ermöglicht besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT	79
5.4	Die Überexpression der Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 ermöglicht besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT und aktiviert die Expression von Detoxifizierungs-Genen	80
5.5	Die Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 beeinflussen die Genexpression verschiedener Gene der Eisen-Aufnahme-Regulation	84
5.6	Die Überexpression der Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 aktiviert die Genexpression von bekannten Stressabwehr-Genen.....	87
5.7	Die Genexpression von Hypoxia-Antwort-Genen wird durch Mutation der Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 nicht beeinträchtigt.....	91
5.8	Zusammenfassung und Ausblick.....	95
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	SUMMARY.....	99
8	ANHANG	101
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	128
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	149
	DANKSAGUNG.....	153
	ERKLÄRUNG DER SELBSTSTÄNDIGKEIT	154

1 Einleitung

1.1 Oxylipine: Signalmoleküle in Mensch und Tier

Oxylierte Lipide, auch Oxylipine genannt, sind im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet (Andreou *et al*, 2009; Brodhun & Feussner, 2011; Funk, 2001; Koo & Howe, 2009). Bei Mensch und Tieren sind sie schon lange als Signalmoleküle bekannt (Euler, 1936; Fels *et al*, 1986; Wasternack & Hause, 2013). Sie werden durch Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*poly unsaturated fatty acids*, PUFAs) gebildet und haben eine kurze Halbwertszeit (Funk, 2001). In humanen Zellen werden Oxylipine aus Dihomogammalinolensäure (DGLA, auch Eikosatriensäure genannt), Arachidonsäure (AA) oder Eikosapentaensäure (EPA) gebildet (Massey & Nicolaou, 2013). Oxylipine können von der Zelle nicht auf Vorrat gebildet werden, sondern werden bei Bedarf stets *de novo* synthetisiert (Funk, 2001). Die benötigten Fettsäuren werden von Acyl-Transferasen und Transacylasen bei Bedarf aus der Membran gelöst (Pérez-Chacón *et al*, 2009). Liegen freie PUFAs vor, so können sie nicht-enzymatisch oder durch drei verschiedene Enzym-Familien in Oxylipine umgewandelt werden: durch Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX) oder Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) (Montillet *et al*, 2004; Massey & Nicolaou, 2013). Da als Ausgangssubstrat verschiedene Fettsäuren dienen und es mehrere Möglichkeiten der Umwandlung gibt, können sehr viele verschiedene Oxylipine gebildet werden. Abbildung 1.1 bietet eine Übersicht über die Entstehung von Oxylipinen im Menschen.

Cyclooxygenasen konvertieren PUFAs zunächst in Prostanoiden. Diese Oxylipine enthalten eine oder mehrere Doppelbindungen und eine charakteristische Ring-Struktur aus fünf Kohlenstoffatomen (Buczynski *et al*, 2009). Zunächst wird mit der COX-Funktion der Cyclooxygenase das instabile Prostaglandin G₂ (PGG₂) gebildet. Über die Peroxidase-Funktion der COX wird PGG₂ zu PGH₂ umgewandelt. Dieses Prostaglandin kann dann durch Zell- und Gewebeselektive Prostanoidsynthasen in viele verschiedene bioaktive Prostaglandine wie PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} und PGI₂ umgewandelt werden (Euler, 1936; Ohki *et al*, 1979; Needleman *et al*, 1986; Buczynski *et al*, 2009; Zivkovic *et al*, 2012). Die zweite Enzym-Familie, die Oxylipine aus Fettsäuren bilden kann, sind Lipoxygenasen. LOX katalysieren die Hydroperoxidation der PUFAs und wandeln sie in Leukotriene, Lipoxine oder Hydroxyeikosatetraensäuren (HETEs) um (Samuelsson, 1983; Miyata & Roman, 2005; Haeggström & Funk, 2011; Strassburg *et al*, 2012). Es gibt sechs humane Lipoxygenasen. Gemäß Ihrer Spezifität für ein bestimmtes C-Atom der Fettsäure werden sie in vier Gruppen eingeteilt: 3-LOX, 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX (Haeggström & Funk, 2011). Als dritte Familie sind die Cytochrom P450 Enzyme zu nennen. Es gibt im Menschen 57 dieser membrangebundenen Hämproteine. Aufgrund der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz können die humanen CYPs in 18 Familien und 43 Unterfamilien eingeteilt werden (McKinnon *et al*, 2008).

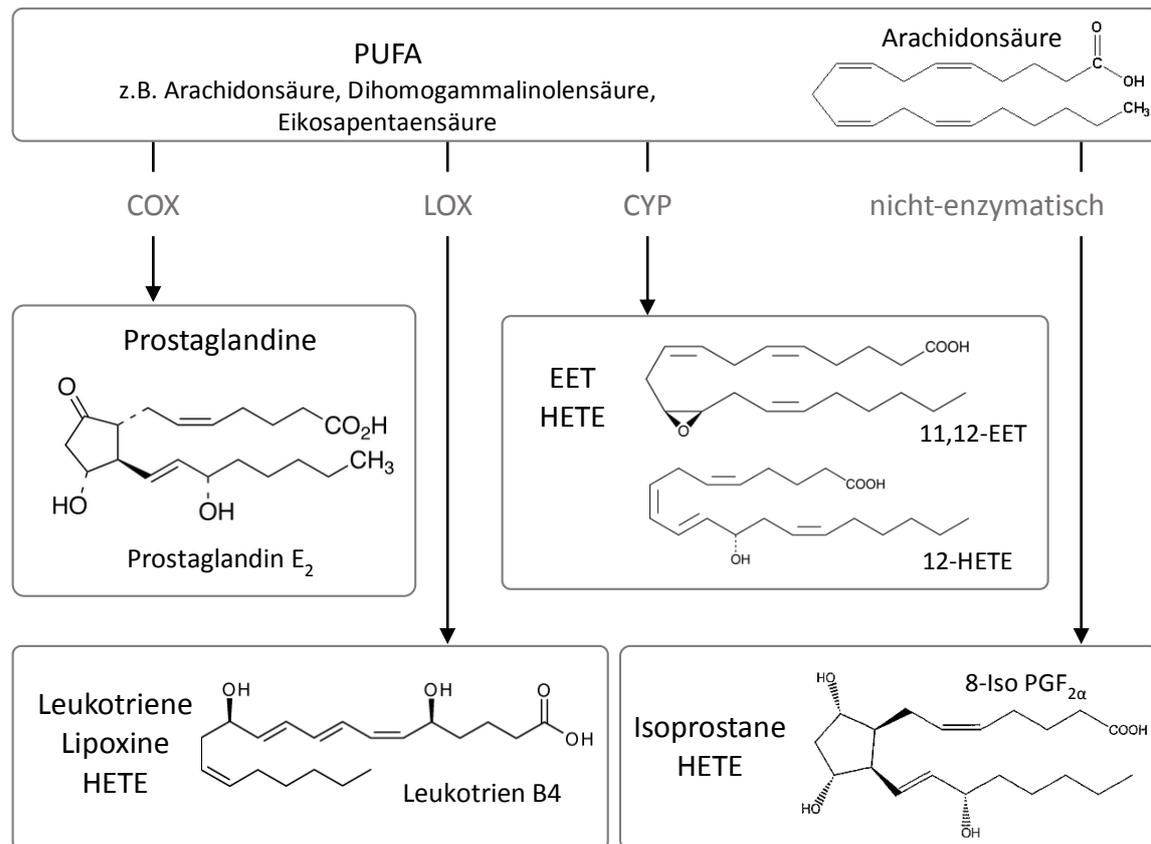


Abbildung 1.1 Die Bildung von Oxylipinen im Menschen. Aus der Membran gelöste freie PUFAs wie Arachidonsäure, Dihomogammalinolensäure und Eikosapentaensäure können über verschiedene Wege zu Oxylipinen umgewandelt werden. Cyclooxygenasen (COX) bilden Prostaglandine (z.B. PGE₂), Lipoxygenasen (LOX) katalysieren die Bildung von Leukotrienen (z.B. Leukotrien B₄), Lipoxinen und Hydroxyfettsäuren (HETE) und Cytochrom P450 Enzyme (CYP) bilden Epoxy- und Hydroxy-Fettsäuren (EET, HETE, z.B. 11,12-Epoxy-Eikosatriensäure oder 12-Hydroxy-Eikosatriensäure). Auf nicht-enzymatischem Weg können Isoprostane (z.B. Isoprostan 8-Iso PGF_{2α}) oder Hydroxy-Fettsäuren entstehen.

Insbesondere die aus Arachidonsäure gebildeten Prostaglandine sind als humane Signalstoffe, z.B. bei Entzündungen und Schmerz sehr gut erforscht (Narumiya *et al*, 1999). Entdeckt wurden sie 1936 von Ulf von Euler, der davon ausging, sie werden nur in der Prostata (englisch: *prostate gland*) gebildet und sie danach benannt hat. Auch wenn man heute weiß, dass Prostaglandine in fast allen Körperteilen gebildet werden, ist der Name erhalten geblieben (Euler, 1936; Oates, 1982). Neben den Prostaglandinen werden auch Thromboxan und Prostacyclin aus Arachidonsäure gebildet, alle drei Gruppen fasst man als Prostanoiden zusammen. Prostaglandin PGE₂ ist eine sehr wichtige schmerzauslösende Substanz im menschlichen Körper und vermittelt sehr viele Entzündungsprozesse wie Rötungen, Schwellungen und Schmerz (Funk, 2001). PGE₂ potenziert außerdem den Schmerz, der durch Bradykinin oder Histamin induziert wird, durch Signalwirkung an bestimmten Nervenzellen (Ferreira, 1972). Auch bei Immunantworten wie Fieber kommt es zur

Bildung von Prostaglandinen (Rossi *et al*, 1997; Ushikubi *et al*, 1998). Das Immunsystem greift ebenfalls auf Prostaglandine als Signalstoffe zurück. Stimulierte Monozyten und Makrophagen sondern große Mengen PGE₂ und Thromboxan A₂ ab (Fels *et al*, 1986). Auch bei Entzündungen sind Prostaglandine beteiligt. PGE₂ und PGI₂ wurden beispielsweise in der Kniegelenksflüssigkeit von Arthritis-Patienten nachgewiesen (Bombardieri *et al*, 1981). Des Weiteren nutzen auch der Gastrointestinaltrakt, das kardiovaskuläre System sowie Niere, Lunge und Gehirn die Prostaglandine als Signalstoffe (Simmons *et al*, 2004). Die Rolle der Prostaglandine bei der Schmerzentwicklung wird schon länger bei der Medikamentenentwicklung genutzt. Acetylsalizylsäure, der Wirkstoff in Aspirin®, ist das erste Medikament, das als COX-Inhibitor entwickelt wurde. Seitdem sind *non-steroidal anti inflammatory drugs* (NSAIDs) die weltweit am meisten genutzten Medikamente gegen Entzündungen und Schmerzen (Melnikova, 2010). Aspirin und Ibuprofen hemmen die COX-Enzyme und somit die Prostaglandin-Synthese. Da keine weiteren Prostaglandine gebildet werden können, lässt der Schmerz nach (Hyde & Missailidis, 2009; Berg *et al*, 2006). Aspirin ist dabei das einzige medizinisch genutzte NSAID, das beide COX-Enzyme COX1 und COX2 hemmen kann. Aufgrund des Aufbaus der Cyclooxygenasen wird COX2 jedoch um etwa 10-100mal schwächer gehemmt als COX1 (Picot *et al*, 1994; Loll *et al*, 1995). Oxylipine und insbesondere Prostanoiden können direkt an Rezeptoren oder Liganden-aktivierbare Transkriptionsfaktoren (TF) binden, oder durch die Plasmamembran diffundieren und an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden um die Signale weiterzuleiten (Wahli & Michalik, 2012).

1.2 Oxylipine: Signalmoleküle in Pflanzen

Bei Pflanzen, insbesondere der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sind Jasmonate die bekanntesten Oxylipine (Wasternack & Hause, 2013). Es sind noch weitere Oxylipine in Pflanzen beschrieben, ihre Funktion bzw. die korrespondierenden Signaltransduktionsprozesse sind bislang erst wenig verstanden.

1.2.1 Bildung von Oxylipinen in *Arabidopsis thaliana*

Auch in Pflanzen werden Oxylipine stets durch Oxidation von ungesättigten Fettsäuren gebildet (Mosblech *et al*, 2009). Das erfolgt entweder in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) auf nicht-enzymatische Weise (Mueller & Berger, 2009) oder spezifisch mit Hilfe von Enzymen. Die enzymatische Bildung kann durch α -Dioxygenase (DOX) (Hamberg *et al*, 2005) oder LOX (Feussner & Wasternack, 2002; Wasternack & Hause, 2013) katalysiert werden. Lipasen lösen PUFAs aus der Zellmembran. Auf nicht-enzymatische Weise werden PUFAs über Radikale in Dinor-Isoprostane umgewandelt (Thoma *et al*, 2003). Auf

enzymatische Weise können durch α -DOX C18- α -Fettsäuren oder C17-PUFAs gebildet werden, durch LOX Enzyme entstehen zunächst Fettsäurehydroperoxide. Diese können dann durch diverse Enzyme in viele verschiedene Oxylipine umgewandelt werden, darunter Jasmonate wie Jasmonsäure (JA) oder 12-Oxophytodiensäure (OPDA), Hydroxy- und Ketofettsäuren (Feussner & Wasternack, 2002; Hamberg *et al*, 2005). Eine Übersicht ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

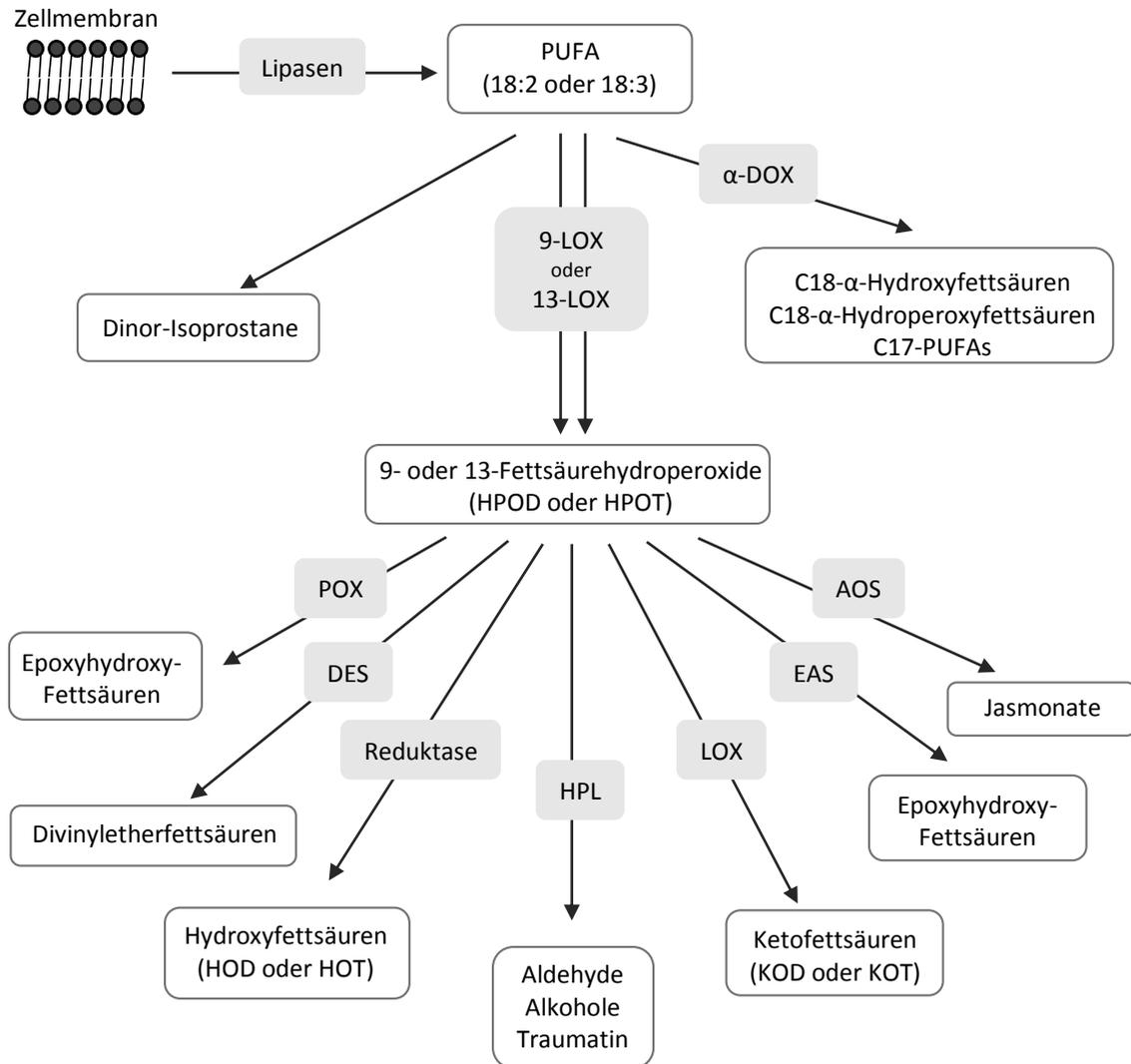


Abbildung 1.2 Die Bildung von Oxylipinen in *Arabidopsis thaliana* (AOS: Allenoxidsynthase, DES: Divinylethersynthase, α -DOX: α -Dioxygenase, EAS: Epoxyalkoholsynthase, HPL: Hydroperoxidlyase, LOX: Lipoxygenase, POX: Peroxygenase, PUFA: polyunsaturated fatty acid, mehrfach ungesättigte Fettsäure, 18:2 Linolsäure, 18:3 Linolensäure, HPOD: Hydroperoxyoktadekadiensäure, HPOT: Hydroperoxyoktadekatriensäure, HOD: Hydroxyoktadekadiensäure, HOT: Hydroxyoktadekatriensäure, KOD: Ketooktadekadiensäure, KOT: Ketooktadekatriensäure). Modifiziert nach Feussner & Wasternack, 2002).

In Abbildung 1.3 ist die enzymatische Entstehung von Oxylipinen in Pflanzen über den Lipoxygenase-Weg dargestellt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden durch Lipasen aus der Membran gelöst und zu Fettsäurehydroperoxiden umgewandelt. Ist das Ausgangsprodukt Linolensäure (18:3), so entsteht Hydroperoxyoktadekatriensäure (HPOT). Läuft dieser Schritt unspezifisch ROS-induziert ab, dann bindet Sauerstoff an ein beliebiges, an einer Doppelbindung beteiligtes Kohlenstoffatom der Fettsäure. Ist die Reaktion enzymvermittelt, erfolgt die Oxidation abhängig von der Spezifität der Lipoxygenase am C-Atom C₉ oder C₁₃ (Feussner & Wasternack, 2002). HPOT kann über eine Reduktase zu Hydroxyoktadekatriensäure (z.B. 9-HOT), über LOX zu Keto-Fettsäuren wie 9-Ketooktadekatriensäure (9-KOT) oder über Allenoxidsynthase (AOS) und Allenoxicyclase (AOC) zu Jasmonaten umgewandelt werden. In *Arabidopsis thaliana* sind LOX1 und LOX5 9-Lipoxygenasen, während LOX2, LOX3, LOX4 und LOX6 C₁₃-spezifisch sind (Bannenber *et al*, 2009a). Aus den Fettsäurehydroperoxiden (HPOT) werden auf unterschiedlichen Wegen Oxylipine mit vielfältigen Funktionen gebildet (Mosblech *et al*, 2009; Andreou *et al*, 2009).

Ein Teil der Oxylipine zeichnet sich durch eine α , β -ungesättigte Carbonylgruppe aus. Verbindungen mit diesem Merkmal besitzen einen elektrophilen Charakter und werden deshalb auch zu den reaktiven elektrophilen Spezies (RES) gezählt (Mueller & Berger, 2009; Farmer & Mueller, 2013). Sie werden bei oxidativem Stress, Verwundung, abiotischem und biotischem Stress gebildet (Alm eras *et al*, 2003; Mosblech *et al*, 2009; Wasternack, 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass RES Oxylipine wie beispielsweise OPDA, Phytoprostane, KOD und KOT die Expression vieler f ur Detoxifizierung bekannte Gene (Cytochrom P450 Enzyme, Glutathion-S-Transferasen GST, Glykosyltransferasen, Oxidoreduktasen oder ABC-Transporter) induzieren (Alm eras *et al*, 2003; Loeffler *et al*, 2005; Mueller *et al*, 2008; Taki *et al*, 2005; Vollenweider *et al*, 2000).

Die Funktionen der Oxylipine sind sehr vielfältig. Sie regulieren beispielsweise die Genexpression (Stintzi *et al*, 2001; Mueller *et al*, 2008) und den Zelltod (Vollenweider *et al*, 2000). Nichtenzymatisch gebildete Oxylipine sind wichtig f ur die pflanzliche Abwehr (Loeffler *et al*, 2005; Mueller & Berger, 2009; Sattler *et al*, 2006) und f ur die Regulation von Genen f ur Stressabwehr, Detoxifizierung und Sekundärmetabolismus (Mueller, 2004; Mueller *et al*, 2008). Die Vielzahl an Oxylipinen kann in drei Gruppen eingeteilt werden: nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine wie Phytoprostane (Sattler *et al*, 2006), Jasmonate / C₁₃-Oxylipine (mit der funktionellen Gruppe am Kohlenstoff 13), dazu geh oren Jasmonsäure und OPDA (Bannenber *et al*, 2009a), und die Gruppe der C₉-Oxylipine (funktionelle Gruppe am C₉), wie 9-HOT, 9-KOT, 9-KOD (Vellosillo *et al*, 2007). Im Folgenden soll besonders auf die Unterschiede zwischen C₉- und C₁₃-Oxylipinen eingegangen werden.

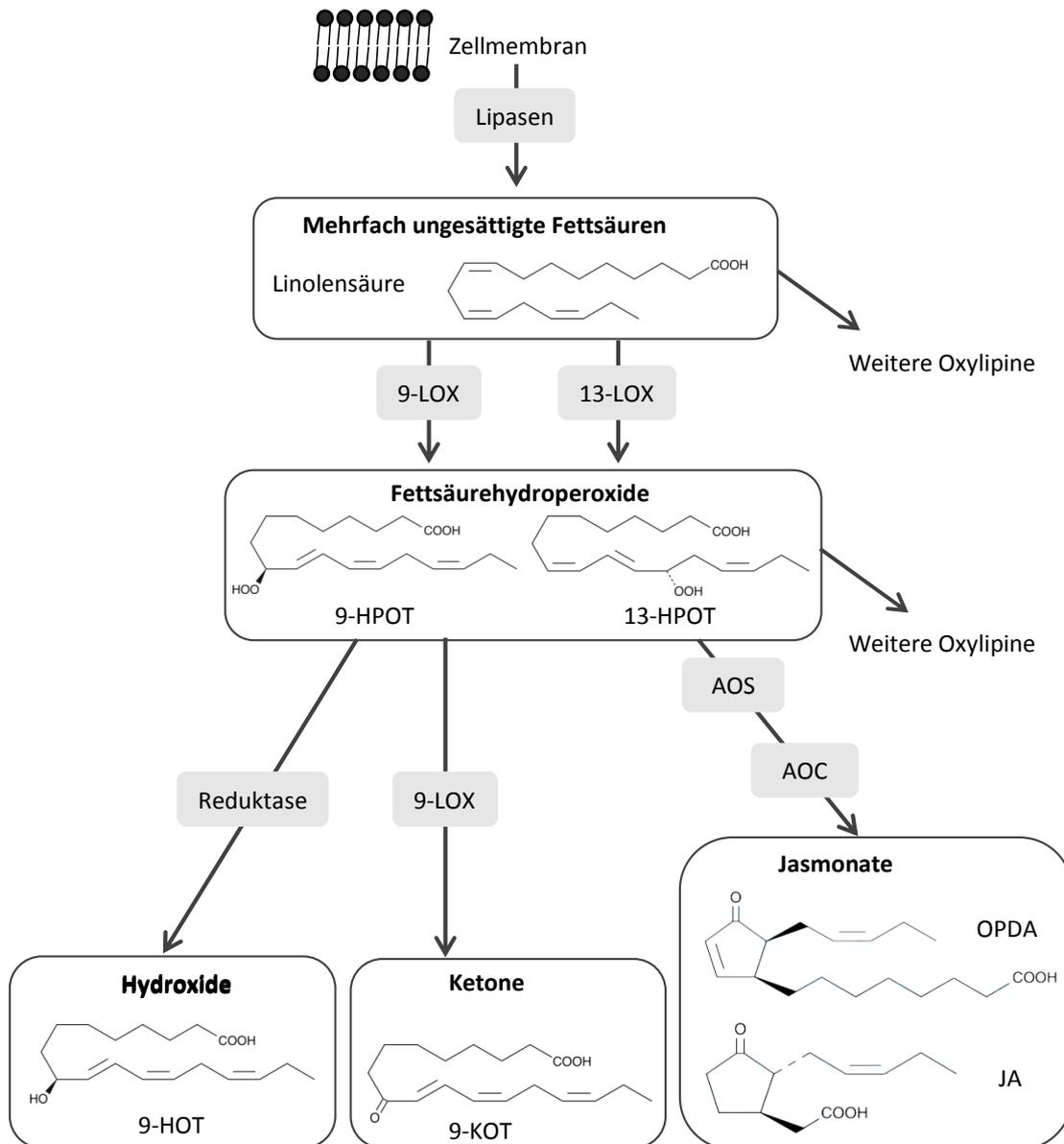


Abbildung 1.3 Enzymatische Synthese von Oxylipinen in Pflanzen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure (18:2) und Linolensäure (18:3) werden durch Lipasen von Membranen abgespalten. Zur besseren Übersicht ist die Synthese hier am Beispiel der Linolensäure erklärt. Durch Lipoxygenasen (LOX), werden die Fettsäuren zu Fettsäurehydroperoxiden (HPOT) umgewandelt, abhängig von der Spezifität der LOX am C₉ oder C₁₃. Aus 13-HPOT werden über Allenoxidsynthase (AOS) und Allenoxidcyclase (AOC) Jasmonate wie OPDA (12-Oxo-Phytodiensäure) und JA (Jasmonsäure) gebildet. Alle Fettsäurehydroperoxide können durch eine bisher unbekannte Reduktase zu Hydroxiden wie HOT (Hydroxyoctadecatriensäure) oder durch LOX zu Fettsäure-Ketonen KOT (Ketoctadecatriensäure) umgewandelt werden. Hier am Beispiel der C₉-Oxylipine gezeigt (modifiziert nach Vellosillo et al, 2007).

1.2.2 Funktion von C₁₃-Oxylipinen

Die bislang am besten erforschten Oxylipine sind die Jasmonate (Delker *et al*, 2006; Wasternack & Hause, 2013). Biotischer Stress oder die Verletzung von Gewebe führt zur schnellen Bildung von Jasmonsäure und der bioaktiven Form Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile). Die stressinduzierte Akkumulation von JA-Ile wurde in über- und unterirdischen Pflanzenteilen nachgewiesen und ist meist eine systemische Antwort (Schilmiller & Howe, 2005; Koo & Howe, 2009; Chauvin *et al*, 2013; Grebner *et al*, 2013; Mousavi *et al*, 2013; Fragoso *et al*, 2014). JA begünstigt weiterhin die Bildung diverser Sekundärmetabolite und Proteine mit Abwehr-Funktion, wie Alkaloide, Terpene, Aminosäurederivate oder *pathogenesis related* (PR)- Proteine (Farmer & Ryan, 1990; Browse & Howe, 2008; De Vleeschauwer *et al*, 2013). Die Bedeutung der Jasmonate für die Abwehr von verschiedenen Lebewesen in *Arabidopsis thaliana* konnten in verschiedenen Studien mit JA-defizienten Mutanten nachgewiesen werden. Untersucht wurden dabei unter anderem nekrotrophe Pathogene wie *Alternaria brassicicola* oder *Botrytis cinerea* (Thomma *et al*, 1998), Blattlaus- (*Myzus persicae*) oder Thrips-Befall (Ellis *et al*, 2002; Zhurov *et al*, 2014), Insekten wie die Minierfliege (Whiteman *et al*, 2011) oder Trauermücken (McConn *et al*, 1997), aber auch Schnecken (Falk *et al*, 2014), Krustentiere wie *Porcellio scaber* (Farmer & Dubugnon, 2009) und Schildkröten (Mafli *et al*, 2012). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass insbesondere herbivore Insekten und nekrotrophe Pathogene anfällig gegenüber der Jasmonsäure-induzierten Abwehr (*JA triggered immunity*, JATI) sind. Die Grundlage der JATI ist die Synthese und Wahrnehmung von JA-Ile (Chico *et al*, 2008; Katsir *et al*, 2008). In nicht gestressten *Arabidopsis*-Blättern sind die Mengen an bioaktiver JA kaum nachweisbar (Glauser *et al*, 2008; Koo & Howe, 2009). Für die Bildung von JA wird in den Plastiden zunächst Linolensäure in 12-Oxo-Phytodiensäure umgewandelt (Vick & Zimmermann, 1979). OPDA wird anschließend in die Peroxisomen transportiert und dort zu JA umgeformt (Howe & Schilmiller, 2002; Schaller & Stintzi, 2009; Wasternack & Hause, 2013). Erst unter Stressbedingungen wird im Cytosol die Aminosäure Isoleucin an die JA konjugiert (Staswick & Tiriyaki, 2004; Kang *et al*, 2006). Diese bioaktive Form des Hormons diffundiert nun in den Zellkern und bindet dort an seine Rezeptoren (Thines *et al*, 2007; Katsir *et al*, 2008; Fonseca *et al*, 2009; Sheard *et al*, 2010). Über den Abbau von JAZ-Repressoren (JASMONATE ZIM DOMAIN) via Ubiquitin-26S-Proteasom reguliert JA-Ile die Genexpression der Abwehr-Gene (Chini *et al*, 2007; Thines *et al*, 2007; Yan *et al*, 2007). Im Grundzustand liegt kaum JA-Ile vor. Die JAZ-Proteine im Nukleus können Transkriptionsfaktoren binden und hemmen. Die Expression der Ziel-Gene wird so blockiert. Gut untersuchte TF, die durch JAZ gehemmt werden sind beispielsweise die basic Helix-Loop-Helix (bHLH) TF MYC2, MYC3 und MYC4 (Fernández-Calvo *et al*, 2011; Schweizer *et al*, 2013; Kazan & Manners, 2013). Werden Stress-Signale detektiert wird zunächst die Bildung von JA-Ile initiiert. Im Zellkern fördert JA-Ile die Interaktion der JAZ-Repressoren mit dem F-Box-Protein COI1

(CORONATINE INSENSITIVE 1). COI1 wird spezifisch von der E3-Ubiquitin-Ligase SCF^{COI1} erkannt und führt zum Abbau der Repressoren (Xie *et al*, 1998; Thines *et al*, 2007; Melotto *et al*, 2008; Sheard *et al*, 2010). Die gebundenen TF werden freigesetzt und können die Expression der JA-Antwort-Gene regulieren. Die Stärke und Dauer der JA-Antwort hängt von der primär gebildeten Menge an JA-Ile ab (Koo & Howe, 2009). Die von JA-induzierten Antworten sind sehr schnell. Die Quetschung von *Arabidopsis*-Blättern beispielsweise führt innerhalb von Minuten zu einer erhöhten JA-Ile-Konzentration, und die Transkripte von JA-Antwort-Genen sind schon 5 Minuten nach der Verwundung nachweisbar (Chung *et al*, 2008; Chauvin *et al*, 2013). Des Weiteren hemmt JA das Wurzelwachstum von wildtypischen Col-0 Pflanzen (Staswick *et al*, 1992).

Die OPDA-Synthese wird in *Arabidopsis* ebenfalls durch Pathogenbefall und Verwundung induziert (Parchmann *et al*, 1997). Alle Jasmonate (OPDA, JA, JA-Ile) vermitteln Stress-Antworten nach abiotischem und biotischem Stress (Wasternack & Kombrink, 2010). Außerdem regulieren sie das Wurzelwachstum, Seneszenz, die Ausbildung von Trichomen und die Reproduktion (Staswick *et al*, 1992; Feys *et al*, 1994; Xie *et al*, 1998; Balbi & Devoto, 2008; Wasternack & Kombrink, 2010). Dabei kommt es nur teilweise zu einer Überlappung der durch OPDA bzw. JA / JA-Ile induzierten Antworten (Böttcher & Pollmann, 2009). Durch beide kommt es bei exogener Zugabe zur Hemmung der Mitose, des Wurzelwachstums und der Keimung (Taki *et al*, 2005). Die endogene Synthese von Jasmonaten ist außerdem essentiell für die Ausbildung fruchtbarer Blüten (Sanders *et al*, 2000). Endogenes OPDA verhindert die Keimung auf JA-unabhängigen Signalwegen (Dave *et al*, 2011). Auch entwickeln JA-defiziente Mutanten immer noch eine Resistenz gegenüber Insekten oder Pathogenbefall (Stintzi *et al*, 2001). Die Sterilität dieser Mutanten wird nur durch Gabe von JA oder Methyl-Jasmonat aufgehoben, nicht aber durch OPDA (Stintzi *et al*, 2001). OPDA schützt außerdem spezifisch gegen nekrotrophe Pathogene wie *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae* oder *Sclerotinia sclerotiorum* (Raacke *et al*, 2006; Stotz *et al*, 2011). Unterschiede gibt es auch in den von OPDA oder JA induzierten Genen (Stintzi *et al*, 2001; Taki *et al*, 2005; Mueller *et al*, 2008).

1.2.3 Die Rolle der C₉-Oxylipine in der pflanzlichen Stressantwort und Entwicklung

C₉-Oxylipine wurden im Vergleich zu JA und OPDA bislang nur wenig erforscht. Sie entstehen, wenn Lipoxygenasen mit Spezifität für das Kohlenstoffatom C₉ die Fettsäure oxidieren (siehe Abbildung 1.3). Das daraus entstandene Fettsäurehydroperoxid (9-HPOD oder 9-HPOT) sowie die weiterhin gebildeten Verbindungen wie beispielsweise 9-HOT oder 9-KOT gehören zu dieser Gruppe (Feussner & Wasternack, 2002; Mueller *et al*, 2006). Von Oxylipinen aus dem 9-LOX Weg weiß man, dass sie bei Entwicklung und Abwehr eine Rolle spielen (Rancé *et al*, 1998; Velloso *et al*, 2007; Hwang & Hwang, 2010; Bannenber *et al*, 2009b). Im Zusammenhang mit Abwehrfunktionen

wurden auch Keto-Fettsäuren erforscht. Die Bildung von 9-KOD und 13-KOD konnte nach Pathogen-Infektion und Verwundung gezeigt werden (Vollenweider *et al*, 2000). Neben JA und OPDA beeinflussen auch andere Oxylipine wie 9-HOT, 9-KOT und 9-KOD, aber auch 13-HOT, 13-KOD oder 13-HOD das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* (Staswick *et al*, 1992; Vellosillo *et al*, 2007). Auch durch 9-Oxononanonsäure, Traumatin, Colnensäure und Colnelensäure wird das Wurzelwachstum gehemmt (Vellosillo *et al*, 2007). Das Oxylipin 9-HOT soll darüber hinaus zu einem gewellten Wurzelwachstum (*root waving*) führen und die Entstehung lateraler Wurzeln hemmen (Vellosillo *et al*, 2007). Pflanzen, in denen durch Mutation von *LOX1* und *LOX5* keine C₉-Oxylipine mehr gebildet werden können, haben vermehrt laterale Wurzeln (Vellosillo *et al*, 2007). Außerdem induziert 9-HOT die Bildung von Polysaccharidablagerungen (Callose) und die Produktion von ROS in Wurzeln und Blättern (Vellosillo *et al*, 2007). Callose wird bei biotischem und abiotischem Stress gebildet, um die Zellwand zu verstärken (Boller & Felix, 2009; Clay *et al*, 2009; Chen & Kim, 2009; Yi *et al*, 2014). Da die JA-insensitive Mutante *coi1-1* sich auf C₉-Oxylipinen wie der Wildtyp verhält, erfolgt die Regulation der ausgelösten Antworten auf JA-unabhängigen Wegen (Vellosillo *et al*, 2007). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die Mutanten *ctr1* (*constitutive ethylene response 1*) und *eto1* (*ethylene overproducer 1*) zum einen resistent gegenüber 9-HOT sind was das Wachstum der Wurzeln betrifft, zum anderen vermehrt Ethylen produzieren (López *et al*, 2011). Die Zugabe von 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC), der Vorläuferverbindung von Ethylen, führte auch bei Wildtyppflanzen auf 9-HOT zu einem normalen Wurzelwachstum (López *et al*, 2011).

Weiterhin ist bekannt, dass die *lox1* Mutanten auch anfälliger gegenüber einer Infektion mit dem virulenten *Pseudomonas syringae* Stamm *PstDC3000* sind (Vicente *et al*, 2012). Die Vorbehandlung mit durch 9-LOX und α -DOX generierten Oxylipinen schützt die Pflanzen vor der bakteriellen Infektion. Der stärkste Effekt wurde mit 9-KOT erzielt (Vicente *et al*, 2012). Die *Pst*-Infektion induziert auch die Bildung von 9-KOT, in den Mutanten *lox1* und *lox1dox1* aufgrund der fehlenden Enzyme jedoch weniger stark. Transkriptom-Analysen haben gezeigt, dass die Vorbehandlung mit 9-KOT das Hormon-Gleichgewicht während der bakteriellen Infektion modifiziert. Daher nimmt man an, dass 9-KOT durch bakterielle Effektoren an den hormonellen Veränderungen beteiligt ist. Die Tatsache, dass die Behandlung mit 9-KOT das Wachstum von *PstDC3000hrpA*, einer Mutante, die an der Effektor-Sekretion beteiligt ist, und dem avirulenten Stamm *PstDC3000avrRpm1* nicht reduziert, konnte diese These bekräftigen (Vicente *et al*, 2012). Studien mit *non responding to oxylipin* (*noxy*) Mutanten haben die Bedeutung von Zellwandmodifikationen als Teil der Antwort auf 9-LOX-induzierte Abwehr gezeigt (Vellosillo *et al*, 2007). Darüber hinaus haben 71% der 41 untersuchten *noxy*-Mutanten zusätzlich eine erhöhte Resistenz gegenüber Isoxaben, einem Herbizid, das die Cellulose-Synthese hemmt und die Zellwand verändert (Vellosillo *et al*, 2013). Drei

dieser Mutanten, *noxy2*, *noxy15* und *noxy18*, zeigen neben der Resistenz gegenüber 9-HOT und Isoxaben eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber *Pseudomonas syringae* DC3000 und eine reduzierte Aktivierung von Genen der Salizylsäure (SA)- Antwort (Vellosillo *et al*, 2013).

Ob durch C₉-Oxylipine spezifische Antworten ausgelöst werden oder sie in der Pflanze nur als Teil eines Stresssignals wahrgenommen werden, ist bislang nicht bekannt. Denkbar ist auch eine Überschneidung der Oxylipin- und der Xenobiotika-Antwort. Für Pflanzen sind Xenobiotika (griechisch: körperfremde Stoffe, *xenos* – fremd, *bios* - Leben) zum Beispiel Herbizide (Ramel *et al*, 2012). Sie führen in der Pflanze zu zahlreichen Veränderungen, darunter Schäden und Verletzungen, die hauptsächlich durch oxidativen Stress, Unterbrechungen der Membran, Lipidperoxidation, Protein- oder DNA-Schäden entstehen (Fufezan *et al*, 2002; Teixeira *et al*, 2007; Ramel *et al*, 2009; Nobels *et al*, 2011).

1.3 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Stressantwort

In allen Eukaryoten sind TF für die Regulation der Transkription von großer Bedeutung (Berg *et al*, 2006). Sie binden an regulatorische Regionen der DNA und können dadurch die Expression eines Gens regulieren, also aktivieren oder inhibieren (Krauss, 2001). Gemäß ihrer Struktur und/oder ihrer spezifischen DNA-Bindungsstellen können sie in Familien eingeteilt werden (Pabo & Sauer, 1992; Qu & Zhu, 2006). Die Bedeutung von TF wird auch in Pflanzen intensiv erforscht (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2009).

1.3.1 Pflanzliche Transkriptionsfaktoren

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* gibt es mehr als 2000 TF (Davuluri *et al*, 2003; Guo *et al*, 2005; Iida *et al*, 2005; Riaño-Pachón *et al*, 2007). Somit sind 5-10% der Gene in *Arabidopsis* TF (Riechmann, 2000). Diese große Zahl an TF kann aufgrund von Homologien in diverse Familien unterteilt werden. Besonders TF aus den Gruppen ERF (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR*), bZIP (basic Leucin-Zipper), WRKY und MYB sind an der Regulation der Abwehr beteiligt (Libault *et al*, 2007; Stotz *et al*, 2013; Robatzek & Somssich, 2001; Frerigmann & Gigolashvili, 2014). Die Abwehrmechanismen in der Pflanze beinhalten zudem die Bildung vieler verschiedener Substanzen zur Resistenzentwicklung (Glawischnig, 2007). Die TF-Familien ERF und bZIP werden im Folgenden genauer vorgestellt.

1.3.1.1 Die Familie der ERF-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der AP2/ERF TF ist mit 124 TF eine sehr große TF-Gruppe (Riechmann, 2000). Der Name ERF steht für *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR*, da diese TF in Tabak in der Ethylen-Antwort als erstes

entdeckt wurden (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Alle TF dieser Familie enthalten eine oder mehrere AP2/ERF Domänen. Diese Domäne besteht aus etwa 60 Aminosäuren und ist verantwortlich für die Bindung des TF an die DNA. Anhand dieser Domäne kann die große Gruppe zunächst in drei Untergruppen eingeteilt werden. AP2/ERF TF besitzen zwei AP2/ERF Domänen, die ERF TF besitzen eine einzelne Domäne und die RAV TF besitzen neben der AP2/ERF Domäne zusätzlich eine B3 Domäne. Die meisten TF dieser Gruppe werden zu den ERF TF gezählt. Anhand phylogenetischer Analysen werden große TF-Familien wie die ERF TF aufgrund ihrer Ähnlichkeit weiter unterteilt. Bei den ERF TF entstehen so zehn verschiedenen große Untergruppen (Nakano *et al*, 2006). Die Bindung an die DNA erfolgt entweder an einer GCC-Box (AGCCGCC), oder an einem *C-repeat-CRT/dehydration-responsive element* (DRE) Motiv (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995).

Die meisten ERF Proteine sind Aktivatoren, wenige ERFs können die Transkription hemmen (Fujimoto *et al*, 2000; Ohta *et al*, 2001). Auf diese Weise können die ERF TF auf viele Signalwege in der Pflanze wirken. So sind sie z.B. an der Entwicklung beteiligt (Elliott *et al*, 1996; Boutilier *et al*, 2002). Auch bei biotischem Stress sind ERF TF wichtig für die Signalwege. Die Pathogenabwehr insbesondere bei Pseudomonaden aber auch bei Verwundung wird von ERF TF reguliert (Libault *et al*, 2007; Gutterson & Reuber, 2004; Oñate-Sánchez & Singh, 2002). Mehrfach wurde gezeigt, dass Überexpression eines ERF TF die pflanzliche Abwehr stärken kann. Die vermehrte Expression von *ERF1*, *ORA59*, *AtERF1* und *AtERF2* führt beispielsweise zu einer erhöhten Transkriptmenge des pflanzlichen Defensins PDF1.2 (Solano *et al*, 1998; Lorenzo *et al*, 2003; Pré *et al*, 2008; Brown *et al*, 2003). Einige TF aus der ERF Familie regulieren Gene für die Abwehr von ROS (Ogawa *et al*, 2005; Wu *et al*, 2008). TF der ERF Familie sind auch in der Hormon-vermittelten Signaltransduktion (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995) wichtig und werden bei abiotischem Stress wie Kälte und Trockenheit vermehrt exprimiert (Stockinger *et al*, 1997; Liu *et al*, 1998). ERF TF regulieren den Stoffwechsel, Überexpression führt z.B. zu vermehrter Wachs-Bildung (van der Fits & Memelink, 2000; Aharoni *et al*, 2004; Broun *et al*, 2004). Auch bei der Entwicklung von Blättern bzw. Spross sind sie von Bedeutung (van der Graaff *et al*, 2000; Banno *et al*, 2001). Durch die Überexpression von CRT/DRE-BINDING FACTOR 1 (CBF1) konnte erstmals gezeigt werden, dass ein einzelnes ERF-Gen einen großen Einfluss auf pflanzliche Stressantworten hat (Jaglo-Ottosen *et al*, 1998). Die Überexpression vieler ERF-TF erhöht die Toleranz gegenüber verschiedenen Stressbedingungen (Weiste *et al*, 2007; Wu *et al*, 2008; Youm *et al*, 2008). Auch in vielen Pathogenese-verwandten Genen sind viele GCC-Boxen zu finden (Brown *et al*, 2003). Die Signaltransduktion zur Pathogenabwehr kann demnach durch ERF TF reguliert werden. Das zeigen auch *Arabidopsis*-Pflanzen, die den TF ERF1 vermehrt exprimieren. Sie sind resistenter gegenüber zwei nekrotrophen Pilzen, aber anfälliger gegenüber *Pseudomonas syringae* (Berrocal-Lobo *et al*, 2002). In Tabak führt

die vermehrte Expression des ERF-Gens *TOBACCO STRESS-INDUCED GENE 1* (Tsi) zu einer größeren Resistenz gegenüber Pathogenen und osmotischem Stress (Park *et al*, 2001).

1.3.1.2 Die Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der bZIP TF in Arabidopsis besteht aus 75 TF (Jakoby *et al*, 2002). Unter bZIP TF sind besonders die TGA TF für die Stressregulation bekannt. Sie sind nach ihrer typischen Bindestelle TGACG benannt und regulieren die Expression von den Stress-Antwort-Genen *PATHOGENESIS RELATED-1* und *GLUTATHION S-TRANSFERASE 6 (GST6)* (Jakoby *et al*, 2002; Lebel *et al*, 1998; Chen & Singh, 1999). Auch die bZIP TF sind an der Regulation der Pathogenantwort beteiligt (Singh *et al*, 2002; Eulgem, 2005). Besonders der TF TGA2 spielt eine wichtige Rolle in der SA induzierten Expression von PR-Genen wie NPR1 (Fan & Dong, 2002; Zhou *et al*, 2000). TGA TF in *Arabidopsis* können auch mit dem Protein *NON-EXPRESSOR OF PR1* (NPR1) interagieren. NPR1 ist wichtig für Salizylsäure-vermittelte Antworten (Zhang *et al*, 1999; Després *et al*, 2000; Zhou *et al*, 2000; Subramaniam *et al*, 2001; Fan & Dong, 2002). Unter normalen Bedingungen bildet NPR1 über Disulfid-Brücken Oligomere und liegt so inaktiv im Cytosol vor. Bei einer Infektion kommt es zur Bildung von SA (Gaffney *et al*, 1993). Größere Mengen an Salizylsäure verändern die Redox-Bedingungen in der Zelle, so dass Thioredoxine die Reduktion der intermolekularen Disulfid-Brücken in den NPR1-Oligomeren katalysieren können. NPR1 liegt dann monomer vor und kann in den Zellkern transportiert werden (Mou *et al*, 2003; Koornneef *et al*, 2008; Tada *et al*, 2008). Dort kommt es zur Wechselwirkung zwischen NPR1 und TFs und dadurch zur Expression von PR Genen (Després *et al*, 2000; Subramaniam *et al*, 2001; Fan & Dong, 2002). Der bZIP TF TGA1 kann zum Beispiel mit NPR1 interagieren. Auch diese Wechselwirkung wird durch die SA-ausgelösten Redoxveränderungen reguliert. Erst bei hohen SA-Spiegeln verändert sich die Konformation von TGA1 und ermöglicht die Bindung an NPR1. Die Bindung an die DNA wird verstärkt und die Transkription aktiviert (Després *et al*, 2003; Lindermayr *et al*, 2010). Nach Stress durch Xenobiotika kann die Aktivität von TGA TF auch post-transkriptionell reguliert werden (Pascuzzi *et al*, 1998; Johnson *et al*, 2001). In *Arabidopsis* ist TGA2 interessanterweise nur in der Salizylsäure-vermittelten Antwort wichtig, jedoch nicht bei Xenobiotika-induziertem Stress (Fan & Dong, 2002). Abhängig von TGA2, TGA5 und TGA6 werden außerdem Gene für Detoxifizierung und Stressantwort durch OPDA und Phytoprostane aktiviert (Mueller *et al*, 2008). Für *CYP81D11* sind die TGA-Bindestellen im Promotor essentiell für JA-induzierte Expression (Köster *et al*, 2012; Stotz *et al*, 2013). Auch das Jasmonat cis-Jasmon aktiviert Gene in Abhängigkeit von TGA2, TGA5 und TGA6 (Matthes *et al*, 2010). Außerdem konnte im Hefe-2-Hybrid-System die direkte Bindung von TGA2 an Glutaredoxine gezeigt werden (Zander *et al*, 2012). Dies bestärkt die Bedeutung von TGA-TF in der Stressabwehr.

1.3.2 Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Genexpression bei Überflutung

Pflanzen besitzen komplexe Mechanismen, um für verschiedene Umwelteinflüsse gewappnet zu sein (Bailey-Serres & Voeselek, 2015). Die Anpassung der Pflanzen an weniger Sauerstoff beispielsweise durch Überflutung erfolgt durch die transkriptionelle und translationelle Regulation bestimmter Gene (Licausi & Perata, 2009). Durch Überflutung ändern sich in der Pflanze viele grundlegende Signalwege (Klok *et al*, 2002; Fukao & Bailey-Serres, 2008; Hattori *et al*, 2009). Der Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen lag hauptsächlich auf den Veränderungen in der Energiebereitstellung, besonders bei Enzymen, die für Glykolyse oder Fermentation notwendig sind (Ellis *et al*, 1999; Kürsteiner *et al*, 2003; Bieniawska *et al*, 2007; Dolferus *et al*, 1994). Neben diesen Genen gibt es noch viele weitere, deren Expression sich nach Überflutungsstress ändert (Klok *et al*, 2002; Liu *et al*, 2005; Kreuzwieser *et al*, 2009; Van Dongen *et al*, 2009; Hsu *et al*, 2011). Es kommt demnach zu weitreichenden Veränderungen in den regulatorischen Signalwegen. TF spielen in Signalwegen sämtlicher Lebewesen eine wichtige Rolle. Um die transkriptionellen Regulationsmechanismen zu verstehen, ist es essentiell, die Rolle der TFs zu entschlüsseln. In den Hypoxia-vermittelten Antworten in *Arabidopsis thaliana* kennt man bereits mehrere TF aus verschiedenen TF-Familien. Dazu gehören TF aus den Familien MYB, NAC, WRKY und ERF (Hinz *et al*, 2010; Licausi *et al*, 2010; Yang *et al*, 2011; Hoeren *et al*, 1998; Christianson *et al*, 2009). Diese TF sind bekannt dafür, die Expression der Alkoholdehydrogenase (ADH) zu aktivieren (Abe *et al*, 2003; Papdi *et al*, 2008; Christianson *et al*, 2009). In Reis wurde SUBMERGENCE 1 A (Sub1A), ein TF aus der Gruppe VII der ERF-Familie (nach Nakano *et al*, 2006), als wichtiger Regulator der Überflutungstoleranz identifiziert (Fukao & Bailey-Serres, 2008; Hattori *et al*, 2009; Fukao *et al*, 2006; Xu *et al*, 2006). Neben Reis konnte auch in *Arabidopsis* und Pappel (*Populus trichocarpa*) die Bedeutung der TF aus der ERF Gruppe VII für die Genregulation nach Hypoxia gezeigt werden (Hinz *et al*, 2010; Licausi *et al*, 2010, 2011; Gibbs *et al*, 2011). Es ist demnach anzunehmen, dass die durch ERF TF vermittelte Antwort auf Sauerstoffmangel stark konserviert ist (Loreti *et al*, 2005; Lasanthi-Kudahettige *et al*, 2007; Kreuzwieser *et al*, 2009). Die Regulation der Hypoxia-Antwort durch die ERF TF der Gruppe VII erfolgt nach der sogenannten *N-end-rule* (NERP, *N-end rule pathway*). Dabei sind die N-terminalen Aminosäuren entscheidend für die Stabilität des Proteins. Das für die Hypoxia-Antwort charakteristische Motiv ist Methionin-Cystein (Met-Cys). In Anwesenheit von Sauerstoff (Normoxie) erfolgt der Abbau des TF, da PLANT CYSTEIN OXIDASEN (PCO) das Protein oxidieren (Weits *et al*, 2014). Auf die Addition eines Sauerstoff-Moleküls erfolgt das Anhängen eines destabilisierenden Arginins durch ARGINYL TRANSFER RNA TRANSFERASEN (ATE) (Weits *et al*, 2014). Im Anschluss daran erfolgt der Abbau über das Proteasom. Unter Hypoxie-Bedingungen fehlt Sauerstoff, das Protein wird nicht oxidiert, ist daher stabil und kann Gene zur Stressbewältigung aktivieren. Dieses Phänomen konnte für HYPOXIA RESPONSIVE 2 (HRE2) und RELATED TO AP2 12 (RAP2.12) gezeigt

werden (Gibbs *et al*, 2011; Licausi *et al*, 2011). Mutation oder Deletion des Met-Cys-Motivs hemmt den Abbau des Proteins und führt so zu einer dauerhaften Aktivierung der Hypoxia-Antwort-Gene. Infolgedessen ist die Überlebensrate nach Sauerstoffmangel erhöht (Gibbs *et al*, 2011). Das Met-Cys-Motiv ist hochkonserviert und liegt in *Arabidopsis* in allen ERF TF der Gruppe VII vor (Bailey-Serres *et al*, 2012). Für den TF RAP2.12 kommt es zudem noch zu einer weiteren Art der Regulation. Unter normalen Sauerstoffbedingungen ist RAP2.12 an das Acyl-CoA-Binde-Protein (ACBP) an der Membran gebunden. Bei Sauerstoffmangel dissoziiert RAP2.12 von ACBP und wandert zur Aktivierung von Hypoxia-Antwort-Genen in den Zellkern. Steigt der Sauerstoffgehalt wieder an, kommt es zum Abbau von RAP2.12 (Licausi *et al*, 2011). Das Met-Cys-Motiv reicht nicht aus, um das Protein über den NERP abzubauen (Gibbs *et al*, 2011). Zusätzlich gibt es auch in der Hypoxia-Antwort TF, die nicht über diesen Weg reguliert werden. In Reis konnte das für Sub1A-1 gezeigt werden (Gibbs *et al*, 2011).

1.3.3 Transkriptionsfaktoren in Oxylipin-vermittelten Antworten

In Tieren kann die Oxylipin-vermittelte Transkription durch ARE (*Antioxidant Response Element*) Promotor-Elemente aktiviert werden, beispielsweise über den bZIP TF Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Das cytosolische Protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) reguliert dabei die Aktivität von Nrf2 (Nguyen *et al*, 2009). In Pflanzen wie *Arabidopsis* gibt es zwar Keap1-ähnliche Proteine, jedoch konnten bislang keine Nrf2-Homologe bZIP-TF identifiziert werden. Durch RES wie Oxylipine werden in Tieren und in Pflanzen jedoch ähnliche Gene aktiviert (Farmer & Davoine, 2007). Es ist bekannt, dass in Pflanzen durch OPDA und verschiedene Phytoprostane Gene induziert werden, die für Entgiftung, Stress-Antworten und Sekundärmetabolismus wichtig sind (Mueller *et al*, 2008). Diese Regulation ist abhängig von den bZIP TF TGA2, TGA5 und TGA6 (Mueller *et al*, 2008; Köster *et al*, 2012). Neuere Studien haben gezeigt, dass die Genregulation in diesem Zusammenhang sehr genau reguliert ist. Beispielsweise wird das Cytochrom P450 Gen *CYP81D11* durch TGA2 und TGA5 reguliert, während TGA5 und TGA6 die Expression von *GST25* beeinflussen (Stotz *et al*, 2013). Sind diese TGA-TF in der Pflanze ausgeschaltet, so zeigt sich auch eine deutlich stärkere Beeinträchtigung hinsichtlich des Wurzelwachstums auf OPDA, Phytoprostanen und JA (Stotz *et al*, 2013). Auch die Antworten auf Behandlung mit cis-Jasmon, einem Jasmonat, ist abhängig von den TF TGA2, TGA5 und TGA6 (Matthes *et al*, 2010). Diese Regulation ist sehr spezifisch, da verwandte TF wie TGA3 keinerlei Einfluss haben (Matthes *et al*, 2010).

1.3.4 Identifikation von Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Stressantwort

Um TF in wichtigen Signalantworten von *Arabidopsis* identifizieren zu können, ist es sinnvoll, Funktionsgewinn-Mutanten zu untersuchen. Von Weiste *et al*, 2007 wurde die AtTORF-Ex (*Arabidopsis thaliana* T_ranskriptionsfaktor O_pen R_eading F_rame Ü_bere_xpression)-Kollektion entwickelt, eine Samenbank von *Arabidopsis thaliana*-Überexpressionslinien verschiedener TF, meist geordnet nach TF-Familien. Abbildung 1.4 zeigt, dass Gateway®-kompatible Vektor-Kollektionen, die 25-60 verschiedene TF-ORF enthalten, simultan in einer einzigen LR-Reaktion in einen Pflanzenexpressionsvektor überführt werden. In diesem Vektor erfolgt die Expression der TF-ORF konstitutiv durch den 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (35S:TF). Ein zusätzlicher N-terminaler HA-Tag ermöglicht in den Pflanzen die Analyse der transgenen Proteine per Western Blot. Dieser Mix aus Vektoren wird nach erfolgreicher Transformation und Amplifikation in *E.coli* in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Mit Hilfe der *Flower Dip*-Methode kann die TF-DNA in *Arabidopsis* transferiert werden (Clough & Bent, 1998).

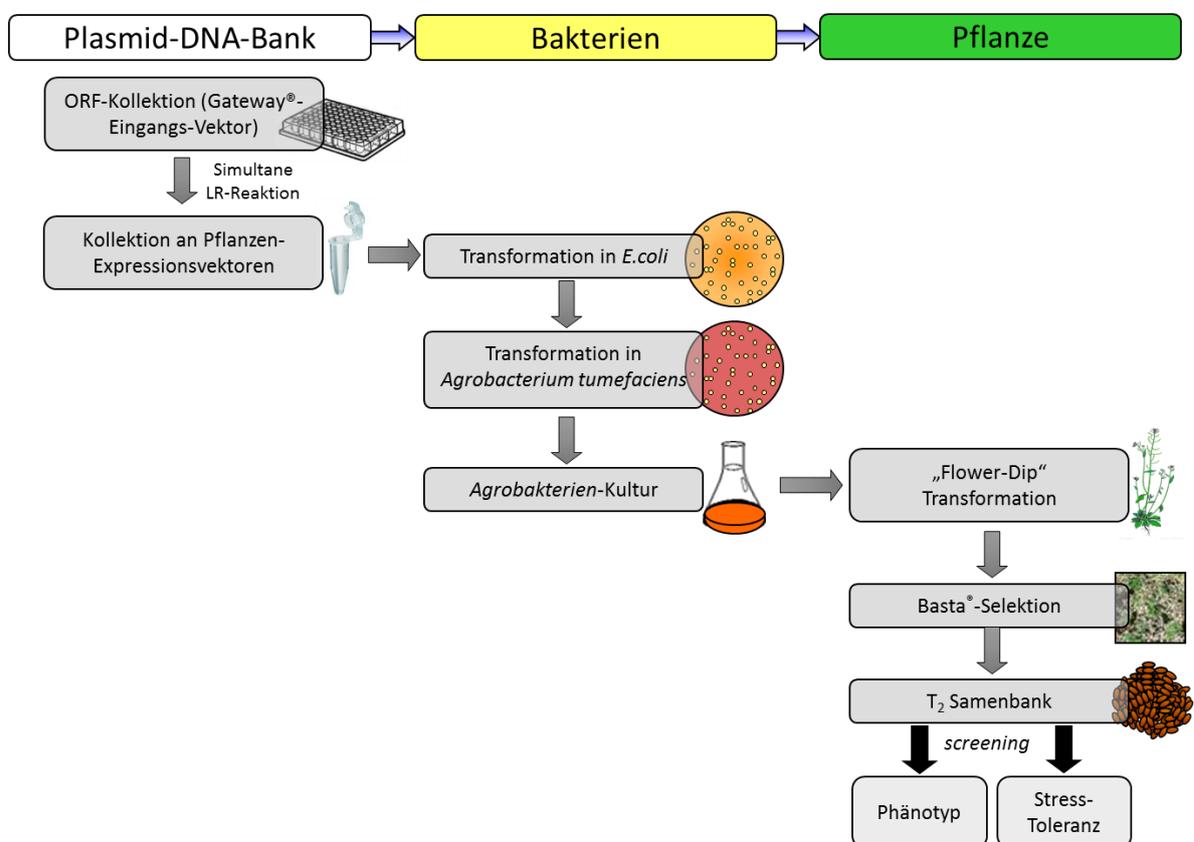


Abbildung 1.4 Aufbau der AtTORF-Ex-Bank. Schematische Darstellung des Ablaufs der Transformation. Die Gateway®-kompatiblen TF-ORF-Kollektionen werden simultan in einen Pflanzenexpressionsvektor transformiert. Nach der Transformation in *E.coli* erfolgt die Transformation in *Agrobacterium tumefaciens* und anschließend mittels *Flower-Dip*-Methode die Transformation in *Arabidopsis thaliana* Wildtyp. Die Samen der transformierten und selektierten Pflanzen (T₂-Generation) können auf verschiedene Eigenschaften hin untersucht werden. Modifiziert nach Weiste, 2011.

Die Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen erfolgt über die ebenfalls in die Pflanzen-DNA integrierte Basta®-Resistenz. Die Samen der resistenten Pflanzen werden zusammen geerntet und stehen dann für die Analyse von TF-Funktionen zur Verfügung. Da die Samenmischungen die T₂-Generation darstellen, bestehen sie zu einem Viertel aus wildtypischen Samen. Je nach Größe der einzelnen TF-Kollektionen variiert die erforderliche Anzahl an Pflanzen, die untersucht werden müssen, damit mit einer Wahrscheinlichkeit von $p > 0,99$ jeder TF mindestens einmal überprüft wird. Bei einem Mix mit 32 verschiedenen TF müssen 255 Pflanzen untersucht werden, damit jeder TF statistisch gesehen ($p > 0,99$) mindestens einmal analysiert wurde (Weiste *et al*, 2007). Daher sollte stets eine genügende Menge an Samen untersucht werden, um eine ausreichende Anzahl an Überexpressionspflanzen zu analysieren und um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Mit Hilfe der AtTORF-Ex-Kollektion kann unter sehr vielfältigen Bedingungen untersucht werden, ob die Überexpression eines TF die Toleranz gegenüber diesem Stress verändert. Die Kollektion wurde schon erfolgreich dafür verwendet, TF zu identifizieren, die Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Weiste *et al*, 2007; Wehner, 2012) und dem Befall durch *Verticillium longisporum* (Iven, 2009) vermitteln. Von Pflanzen, die den gewünschten Phänotyp zeigen, wird DNA isoliert und über PCR mit Oligonukleotiden spezifisch für die *att*-Sequenzen in der integrierten 35S:TF-Kassette die *att*-TF-*att*-Sequenz amplifiziert. Die Sequenzierung dieser DNA-Abschnitte ermittelt so den transgen integrierten TF.

1.4 Zielsetzung

TF sind auch in *Arabidopsis thaliana* an den meisten Signalwegen beteiligt. Von den mehr als 2000 TF in *Arabidopsis* ist bislang aber nur ein kleiner Teil charakterisiert (Davuluri *et al*, 2003; Guo *et al*, 2005; Iida *et al*, 2005; Riaño-Pachón *et al*, 2007). Das Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation und Charakterisierung weiterer, bislang unbeschriebener TF in *Arabidopsis thaliana*. Der Fokus liegt dabei auf TF, die die Antwort auf C₉-Oxylipine verändern. Dass TF eine Rolle in der C₁₃-Oxylipin-vermittelten Signalantwort haben, wurde schon gezeigt (Stotz *et al*, 2013). Aber auch C₉-Oxylipine wirken in *Arabidopsis thaliana* als Signalmoleküle. Vorversuche haben gezeigt, dass das C₉-Oxylipin 9-HOT ein im Vergleich zum Wildtyp verkürztes Wurzelwachstum hervorruft. Es ist zu erwarten, dass Pflanzen, die TF überexprimieren, ein normales Wurzelwachstum zeigen, da die vermehrte Anwesenheit des TF in die pflanzlichen Signalwege eingreifen kann (Abbildung 1.5). Dieser Phänotyp ist aber nur dann möglich, wenn die TF in Signalwege zum Umgang mit Oxylipinen wie 9-HOT eingreifen. Zur Identifikation von TF in 9-HOT induzierten Antworten in *Arabidopsis thaliana* soll die AtTORF-Ex-Kollektion verwendet werden.

Diese Kollektion soll hinsichtlich des Wurzelwachstums auf 9-HOT durchmustert werden. Col-0 zeigt auf 9-HOT ein verkürztes Wurzelwachstum. 35S:TF-Pflanzen, die auf 9-HOT ein verbessertes Wurzelwachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigen, sollen weiter charakterisiert werden. TF können auf verschiedene Weisen in 9-HOT vermittelte Signalwege eingreifen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die TF die Bildung endogener Oxylipine hemmt, wodurch die Pflanze mit höheren Mengen an exogenem Oxylin umgehen kann. Auch kann es sein, dass TF den Abbau von 9-HOT verstärken, oder generell die Entgiftungswege anschalten. Möglich ist auch ein Eingriff der TF in (Oxylin-induzierte) Signalwege, was durch Transkriptom-Analysen mit Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten untersucht werden kann. Es ist denkbar, dass TF beispielsweise die allgemeine Stressabwehr in der Pflanze aktivieren, und somit der Umgang mit 9-HOT zu einem geringeren Stressanstieg führt, als in Wildtyp-Pflanzen. Dies kann auch unspezifisch von 9-HOT geschehen.

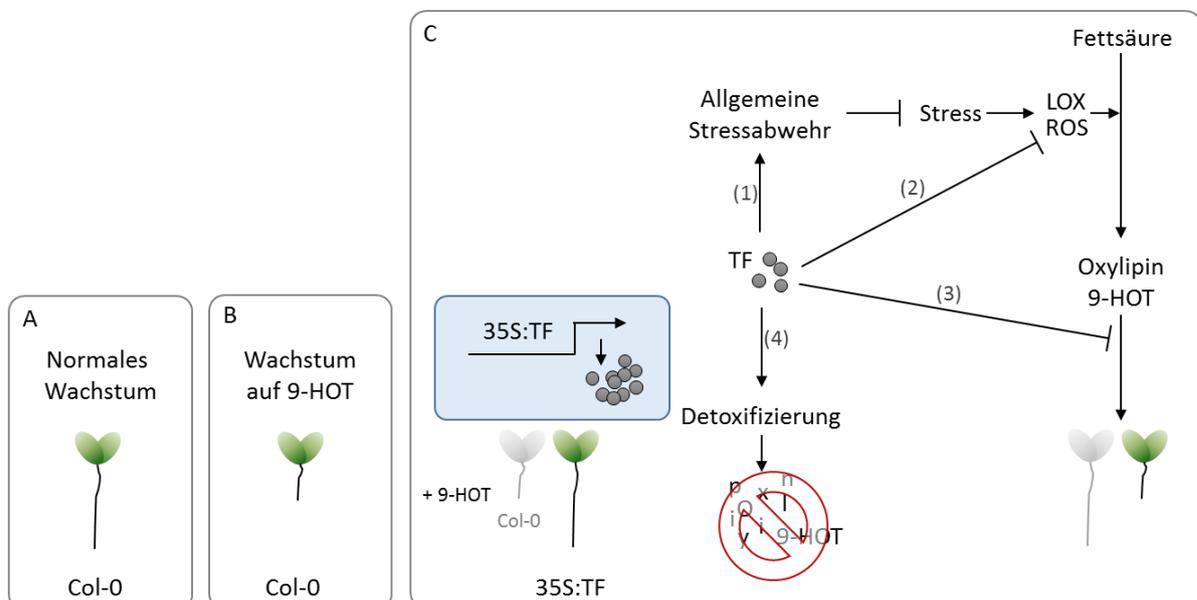


Abbildung 1.5 Modell zur Identifikation von TF, beteiligt an Oxylin-vermittelter Signaltransduktion. Pflanzen wachsen auf dem Oxylin 9-HOT deutlich verkürzt (vergleiche A und B). (C) Die Überexpression von TF (35S:TF) führt zu einem verbesserten Wachstum auf 9-HOT, verglichen mit wildtypischem Wachstum (Col-0 in grau). Das kann verschiedene Gründe haben. (1) Die TF aktivieren die generelle Toleranz gegenüber Stress. (2) Stress führt zur Umwandlung von Fettsäuren in Oxyline durch Enzyme wie Lipoxygenasen (LOX) oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS). TF reduzieren den Stress oder direkt die Biosynthese der C9-Oxyline. (3) TF greifen in die Oxylin-vermittelten Signalwege ein. (4) Durch die TF werden Proteine für die Detoxifizierung des Oxylins aktiviert. (Pfeile: aktivierend, Balken: hemmend, Kreise: TF-Proteine).

Die Funktion der TF, die bei der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion ein verlängertes Wurzelwachstum auf 9-HOT gezeigt haben, soll im weiteren Verlauf genauer charakterisiert werden. In erster Linie gilt es herauszufinden, ob der auf 9-HOT gezeigte Phänotyp spezifisch ist,

oder auch auf anderen Oxylipinen zu beobachten ist. Dies gibt Aufschluss darüber, in welche Signalwege die TF möglicherweise eingreifen. Unabhängig der Spezifität des Phänotyps sollen Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten erstellt und hinsichtlich ihres Phänotyps analysiert werden. Zur Identifikation von Ziel-Genen sollen mit diesen Pflanzen auch Transkriptom-Analysen erfolgen. Die Verifikation dieser Ziel-Gene soll weiterhin mit quantitativer realtime-PCR und Chromatin-Immunopräzipitation erfolgen.

2 Material

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5a	recA1 relA1 thi-1 DlacU 169 80 (lacZDM15) hsdR17 (r _k m _k +)	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> DB3.1	F- gyrA462 endA1 D(sr1- recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl-5 λ-leu mtl-1	(Bernard, 1993)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK, Rif ^R , Gm ^R	(Koncz & Schell, 1986)

2.1.2 Pflanzen

Kultivar	Eigenschaften	Herkunft
Columbia Col-0 N1092	Wildtyp	Kultursorte
<i>erf106</i> (SALK_097771)	AtERF106 Knock Out	NASC Stock Center
<i>erf107</i> (SALK_015182)	AtERF107 Knock Out	NASC Stock Center
<i>erf106xerf107</i>	AtERF106 und AtERF107 Knock Out	Diese Arbeit
Prom35S:AtERF106	AtERF106 Überexpression mit HA-Tag	Diese Arbeit
Prom35S:AtERF107	AtERF107 Überexpression mit HA-Tag	Diese Arbeit
XVE-AtERF106-1A XVE-AtERF106-4E	β-Estradiol induzierbare AtERF106 Überexpression mit HA-Tag	Diese Arbeit
XVE-AtERF107-2i XVE-AtERF107-4A	β-Estradiol induzierbare AtERF107 Überexpression mit HA-Tag	Diese Arbeit
XVE-AtbZIP11	β-Estradiol induzierbare AtbZIP11 Überexpression mit HA-Tag	(Weiste, 2011)
XVE-ami-AtbZIP2/AtbZIP11/AtbZIP44	β-Estradiol induzierbare Repression von AtbZIP2, AtbZIP11 und AtbZIP44	(Weiste, 2011)
<i>tga256</i>	Knock Out von AtTGA2, AtTGA5 und AtTGA6	(Zander <i>et al</i> , 2010)
<i>tga256</i> 35S:TGA2 #7F	Überexpression von TGA2 im <i>tga256</i> -Knock Out	(Zander <i>et al</i> , 2010)
<i>tga256</i> 35STGA5 #14D	Überexpression von TGA5 im <i>tga256</i> -Knock Out	(Zander <i>et al</i> , 2010)
35S:CYP81D11	AtCYP81D11 Überexpression	(Köster <i>et al</i> , 2012)
<i>cyp81d11</i>	AtCYP81D11 Knock Out	(Köster <i>et al</i> , 2012)

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pDONR201	pUC ori, Km ^R , attL1, Cm ^R , ccdB, attL2	Invitrogen, 2001
pDONR201-ERF106	pUC ori, Km ^R , attL1, Cm ^R , ORF ERF106, attL2	Diese Arbeit
pDONR201-ERF107	pUC ori, Km ^R , attL1, Cm ^R , ORF ERF107, attL2	Diese Arbeit
pMDC7-HA	ProG10-90:XVE, Hyg ^R , ProOLexA-46, HA-Tag, attR1, ccdB, attR2, Spec ^R , binärer Vektor	(Weiste, 2011), (Zuo <i>et al</i> , 2000)
pMDC7HA-ERF106	ProG10-90:XVE, Hyg ^R , ProOLexA-46, HA-Tag, attR1, ORF ERF106, attR2, Spec ^R , binärer Vektor	Diese Arbeit
pMDC7HA-ERF107	ProG10-90:XVE, Hyg ^R , ProOLexA-46, HA-Tag, attR1, ORF ERF107, attR2, Spec ^R , binärer Vektor	Diese Arbeit

2.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'--->3'	Zweck
attREV	CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG	PCR
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	PCR
ASA1 for	ATGCATATAAGCTCCACGGTGAC	qRT-PCR
ASA1 rev	GTACGTCCCAGCAAGTCAAACC	qRT-PCR
bZIP11 for	CGATTCAAACGTCGTCAGG	qRT-PCR
bZIP11 rev	TCCGTTTACGTTTCTCTGC	qRT-PCR
CYP71A12 for	TGTGGTGTGGTCCCTATG	qRT-PCR
CYP71A12 rev	TTGTCGTGAGCAGATTGAGA	qRT-PCR
CYP71A13 for	GATGTTGTGTTTGCTCCCTATG	qRT-PCR
CYP71A13 rev	TTGTTGGTGAGCAGATTGAGA	qRT-PCR
CYP81D11 for	ATTGCCGAGGTAGTTGT	qRT-PCR
CYP81D11 rev	TTGCCTTCGTAATACT	qRT-PCR
CYP81F2 for	GAAGATGTTGACATGACAGAG	qRT-PCR
CYP81F2 rev	TGCTTAAACCGGTAAACTTC	qRT-PCR
CYP83B1 for	ACCGTGTGCGCAAGTTTCAG	qRT-PCR
CYP83B1 rev	TCTTGTCATCATCCGTTGAC	qRT-PCR
SALK_097771_ERF106KO_for	AGTGCCGTTGAGAATCAAATG	PCR
SALK_097771_ERF106KO_rev	GCAACTTGCAAGCACACTAAAC	PCR
ERF106 for	AAGTGAAGGGGAATCATCA	qRT-PCR
ERF106 rev	AGTTCATATGTTGATGACGATGAA	qRT-PCR
ERF106 3'UTR for	GAGCAGTTTCTTAAGTTGTATAA	qRT-PCR
ERF106 3'UTR rev	TCTAAATCTTAGGGACATGAAGAA	qRT-PCR
SALK_015182_ERF107KO_for	CAGCTTAGGATTCGAACCATG	PCR
SALK_015182_ERF107KO_rev	GAAAACGCAGAAGTTCCATTG	PCR
ERF107 for	TTTGCAGCAGAGATTGAGAA	qRT-PCR
ERF107 rev	AAAAGTGCCTAACCAAATCCTG	qRT-PCR
ERF107 3'UTR for	GGTTAATATCTTAAGTATGTGAAGC	qRT-PCR
ERF107 3'UTR rev	GCAAGAGTTCTTTTCAGTACTACTA	qRT-PCR
GSTF6 for	TACGAACACAGGCTTGGTGA	qRT-PCR
GSTF6 rev	GATCGACCAAAGTGAAGTGGT	qRT-PCR
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synthese

Oligonukleotid	Sequenz 5'--->3'	Zweck
pBT10 for	CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA	PCR
PDC2 for	CAGCTTTTGTGAGGCCATAC	qRT-PCR
PDC2 rev	ATCTCACCTTGGCAGTCCAG	qRT-PCR
PDC3 for	ATGGTGAAGGCAAATGCTG	qRT-PCR
PDC3 rev	CCGTGTTAATCGCTTCCACT	qRT-PCR
pE-HA LB	CGTCCCGGACTATGCAGATA	Sequenzierung
pE-HA RB	CGTATGGATAACCCCATCA	Sequenzierung
pMDC7HA for	CGGACTATGCAGATATCTCTAGGC	Sequenzierung
pMDC7Harev	CCGATGATACGGACGAAGCTGG	Sequenzierung
Random Nonamer	NNNNNNNNN	cDNA-Synthese
SeqL1	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Sequenzierung
SeqL2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Sequenzierung
UBQ5 for	GACGCTTCATCTCGTCC	qRT-PCR
UBQ5 rev	GTAAACGTAGGTGAGTCCA	qRT-PCR

2.3 Nährmedien

Alle Medien wurden für 30 min bei 121°C und 2 Bar autoklaviert. Zusätze wurden aufgrund ihrer Thermosensitivität erst nach dem Autoklavieren ins Medium gegeben.

2.3.1 Medium für Bakterien

Medium	Bestandteile
DYT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl autoklavieren
LB-Medium (Sambrook et al., 1989)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7,4 mit NaOH autoklavieren
YEB-Medium (Sambrook et al., 1989)	5 g/l Beefextrakt 5 g/l Pepton 1 g/l Hefeextrakt 5 g/l Saccharose 2 mM MgSO ₄ pH 7,0 mit NaOH autoklavieren

Für Platten nach Einstellen des pH-Wertes, aber vor dem Autoklavieren zusätzlich 12 g/l Koble-Agar zugeben.

2.3.2 Medium für Pflanzen

Medium	Bestandteile
1xMS-Medium (Murashige & Skoog, 1962)	4,4 g/l Murashige & Skoog Medium 1 % (w/v) Saccharose pH 6,0 mit KOH autoklavieren

Für Platten nach Einstellen des pH-Wertes, aber vor dem Autoklavieren zusätzlich 1 % (w/v) Phyto-Agar zugeben.

2.3.3 Zusätze

Substanz	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	Duchefa
Hygromycin (Hyg)	40 µg/ml	Duchefa
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml	Duchefa
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml	Duchefa
9-HOT (9-Hydroxyoctadecatriensäure)	25 µM	Mats Hamberg, Uni Stockholm
9-KOT (9-Ketooctadecatriensäure)	25 µM	Mats Hamberg, Uni Stockholm
9-KOD (9-Ketooctadecadiensäure)	25 µM	Mats Hamberg, Uni Stockholm
TIBA (Trijodbenzoesäure)	20 µM	Sigma-Aldrich
NAA	0,25 µM	Sigma-Aldrich
Linolensäure	25 µM	Sigma-Aldrich
Jasmonsäure	10 µM	Sigma-Aldrich
OPDA (12-Oxophytodiensäure)	2 µM	AG M. J. Mueller, Uni Würzburg

2.4 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agar-Agar (Bacteriological) Kobe I	Carl Roth
Agarose NEEO Ultra	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat APS	Carl Roth
β-Estradiol	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Carl Roth
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
Dimethylsulfoxid DMSO	Carl Roth
dNTPs	Fermentas
EDTA 25 mM für DNase Verdau	Fermentas
Ethanol absolut	Carl Roth
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth
Formaldehyd	Carl Roth
Formamid	Carl Roth
Glycerin 87 %	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
Magermilchpulver	Applichem
Murashige & Skoog-Medium	Duchefa
Natriumhypochlorit	Carl Roth

Produkt	Hersteller
Natriumdodecylsulfat SDS	Carl Roth
Organische Lösungsmittel (Alkohole etc.)	Carl Roth, Merck
Pepton	Carl Roth
Phenol	Sigma-Aldrich
Phyto-Agar	Duchefa
Ponceau Rot	Sigma-Aldrich
Rifampicin	Duchefa
Saccharose	Carl Roth
Salzsäure	Diagonal
SERVA DNA Stain G	Serva
Silwet L77	Lehle Seeds
Sybr Green	Lonza
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamidin)	Carl Roth
Trishydroxymethylaminomethan Tris	Carl Roth
Triton X-100	Carl Roth
Tween	Sigma-Aldrich
verschiedene Salze	Carl Roth

Alle hier nicht genannten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Carl Roth, Merck, oder Sigma bezogen.

2.5 Enzyme, Kits und Größenstandards

2.5.1 Enzyme

Enzym	Hersteller
Biotaq-DANN-Polymerase	Bioline
BP-Clonase II Enzym-Mix	Life Technologies
DnaseI, Rnase-frei	Fermentas
H Minus M-MuIV Reverse Transkriptase	Fermentas
LR-Clonase II Enzyme mix	Life Technologies
Restriktionsenzyme	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Biozym

2.5.2 Kits

Kit	Hersteller
Enhanced Chemiluminescence Kit (ECL)	VWR
Nucleospin® Extract	Macherey-Nagel
NucleoBond® MaxiKit	Macherey-Nagel
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel
NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina	New England Biolabs

2.5.3 Größenstandards

Als DNA-Größenstandard wurden bei der Gelelektrophorese der Generuler DNA Ladder Mix von Fermentas verwendet. Bei SDS-Gelen wurde der Page Ruler-Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.

2.6 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Eigenschaft	Verdünnung	Hersteller
anti HA IgG ChIP-grade	HA-Epitoptag (YPYDVPDYA)	polyklonal aus Kaninchen	1:2000	abcam
anti rabbit IgG	Kaninchen-Immunoglobulin	polyklonal, HRP-gekoppelt	1:10000	abcam

2.7 Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung: 50 % Methanol 10 % Essigsäure 0,2 % Coomassie Brilliantblau G250	CTAB (DNA-Extraktion): 2 % CTAB 100 mM TrisHCl pH 8,0 20mM EDTA pH 8,0 1,4 M NaCl 2 % β -Mercaptoethanol vor Gebrauch zugeben.
DEPC-H₂O (RNA-Extraktion): 1 l H ₂ O 1 ml DEPC kräftig schütteln, ü.N. unterm Abzug ausdampfen lassen, autoklavieren	Estradiol (Estradiol-Induktion): 10 mM β -Estradiol (0,027 g/10 ml) in DMSO
Fällungspuffer (RNA-Extraktion): 1,2 M NaCl 0,8 M tri-Natrium-Citrat	Harnstoffextraktionspuffer: 4 M Harnstoff 16,6 % Glycerin 5 % β -Mercaptoethanol 5 % SDS einige Krümel Bromphenolblau
Laufpuffer 1x (SDS-PAGE): 25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS	Laufpuffer für Agarosegele: 10 ml TAE 10 ml Glycerin (87 %) 0,2 % Bromphenolblau 0,2 % Orange G 0,2 % Xylencyanol (oder nur einen Farbstoff)
MEN-Puffer 10x (RNA-Gel): 200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH	Ponceau-Rot Färbelösung für Proteine: 0,02 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
RNA-Probenpuffer (2,5x): 20 % MEN 8 % Glycerin 56,7 % Formamid	Sammelgel (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

5 % Formaldehyd 0,001 % Bromphenolblau 0,1 % Ethidiumbromid 4 mM EDTA pH 7,5	0,05 ml 10 % APS 0,005ml TEMED 3,4 ml H ₂ O
TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat (pH 8,6) 1 mM EDTA	TBS (Western Blot): 50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,6 mit HCl
TBS-T (Western Blot): TBS 0,1 % Tween 20	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-Puffer gesättigt 0,8 M Guanidiniumthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 33,4 ml/l Na-Acetat (3 M, pH 5,2 mit Essigsäure) 5 % Glycerin

2.8 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VE-100	Systemec
Automatische Pipetten		Gilson
ChemiDoc MP Imaging System		Biorad
Digitalkamera		Nikon
Eismaschine	MF26	Scotsman
Experion Automated Gelelectrophoresis System		Biorad
Gefriertruhe -80°C	C66085	New Brunswick Scientific
Geldokumentationsanlage		Intas
Gelelektrophoresekammer		Werkstatt Universität Würzburg
Inkubationsschrank		Memmert
Klimaschrank		Percival, Binder
Kühlschränke		Liebherr, Bomann, u.a.
PCR-Gerät	T Personal, T Gradient	Biometra
pH-Meter		inoLab
Photometer		Nanodrop
Polyacrylamid-Gelkammer		AGS
RealTimePCR	CFX96	Biorad
Scanner	hp Scanjet 3670	HP
Schüttler		Mytron
Semi-Dry-Blot Apparatur		Werkstatt Universität Bielefeld
Sterilbank		NuAir, Ceag Envirco
Tischzentrifuge		Eppendorf
Tischzentrifuge, gekühlt		Eppendorf
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries

Gerät	Modell	Hersteller
Waage, Feinwaage		Kern
Wasseraufbereitungsanlage	RiOS Water Purification System	Millipore
Zentrifuge, Ausschwingrotor		Hettich

2.9 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Alufolie	Profissimo
Fließpapier	Whatman
Gläser	Weck
Glasmaterialien	Brand, Schott
Haushaltsfolie	Tip
Immobilon-P, PVDF-Transfer-Membran	Hartenstein
Kunststoff-Einwegmaterial: Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße, Spritzen, Petrischalen usw.	Eppendorf, Greiner, Sarstedt, Hartenstein
Parafilm N	Hartenstein

2.10 Verwendete Computerprogramme und Internetdienste

Name	Quelle	Verwendungszweck
AGRIS	(Davuluri <i>et al</i> , 2003)	TF-Bindestellen-Analyse
AthaMap	(Galuschka <i>et al</i> , 2007; Bülow <i>et al</i> , 2009, 2010)	TF-Bindestellen-Analyse
Blast	(Altschul <i>et al</i> , 1997; Schäffer <i>et al</i> , 2001)	Suche von ähnlichen DNA- oder Proteinsequenzen
Bowtie 2	(Langmead & Salzberg, 2012)	Abgleich der RNAseq-Daten mit dem <i>A. thaliana</i> Genom
DAVID	http://david.abcc.ncifcrf.gov/	Gene Ontology Annotation
fastQC	http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/	Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten der RNA-Transkriptom-Analysen
Geneious	Biomatters Limited	Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen
Genevestigator	(Hruz <i>et al</i> , 2008) https://www.genevestigator.ethz.ch	
Office 2010, 2013 (Excel, Powerpoint, Word)	Microsoft	Auswertung, Präsentation und Dokumentation der Daten
R, The R Project for Statistical Computing	(Hornik 2015) http://www.r-project.org/	Analyse der RNAseq-Daten
RootsTool	Grzegorz Zysko, August 2004 zysko@tlen.pl	Ausmessen der Wurzellängen
Tair <i>Arabidopsis</i> Datenbank	http://www.arabidopsis.org	<i>Arabidopsis thaliana</i> Datenbank
VENNY	(Oliveros, J.C., 2007) http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html	Erstellung der Venn-Diagramme

3 Methoden

3.1 Pflanzen-Anzucht

3.1.1 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis thaliana*-Samen

Für die sterile Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen und zur Vermeidung von Kontaminationen muss eine Oberflächensterilisation durchgeführt werden (Clough und Bent, 1998). Dazu wurde 12 %ige Natriumhypochloritlösung in ein Becherglas gegeben und in einen Exsikkator gestellt. Reaktionsgefäße (2 ml) mit einigen Samen (Schichtdicke etwa 3 mm) wurden in einem Kunststoffständer auf das Becherglas gestellt. Nach Zugabe von 5 ml HCl (37 %) zur Natriumhypochloritlösung wurde der Exsikkator umgehend geschlossen. Nach 3-4 h wurde der Exsikkator unter dem Abzug geöffnet und die Reaktionsgefäße wurden zum Ausdampfen unter die Sterilbank gestellt.

3.1.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzuchterde wurde vor der Verwendung einmal bei 90°C autoklaviert, um Pilze und Pilzsporen abzutöten. Die sterilen Samen wurden auf den vorbereiteten MS-Platten oder auf Erde verteilt. Nach der Aussaat auf Erde wurden die Samen für zwei bis vier Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert, um eine gleichmäßigere und bessere Keimung zu erreichen. Die Platten wurden mit Leukopor verschlossen und anschließend ebenfalls stratifiziert. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) oder unter 12 h Licht / 12 h Dunkel-Bedingungen kultiviert.

3.1.3 Die AtTORF-Ex-Kollektion, eine Sammlung von TF-Überexpressionslinien

Um TF in wichtigen Signalantworten von *Arabidopsis* identifizieren zu können, ist es sinnvoll, Funktionsgewinn-Mutanten zu untersuchen. Von Weiste *et al*, 2007 wurde die AtTORF-Ex (*Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor ORF Überexpression)-Kollektion entwickelt, eine Samenbank von *Arabidopsis thaliana*-Überexpressionslinien verschiedener TF, meist geordnet nach TF-Familien. Dafür werden Gateway®-kompatible Vektor-Kollektionen, die 25-60 verschiedene TF-ORF enthalten, simultan in einer einzigen LR-Reaktion in einen Pflanzenexpressionsvektor überführt. In diesem Vektor erfolgt die Expression der TF-ORF konstitutiv durch den 35S:Promotor. Dieser Mix aus Vektoren wird nach erfolgreicher Transformation und Amplifikation in *E.coli* in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Mit Hilfe der „Flower Dip“-Methode (Clough & Bent,

1998) kann die TF-DNA in *Arabidopsis* transferiert werden. Die Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen erfolgt über die ebenfalls in die Pflanzen-DNA integrierte Basta®-Resistenz. Die Samen der resistenten Pflanzen werden zusammen geerntet und stehen dann für die Analyse von TF-Funktionen zur Verfügung. Da die Samenmische die T₂-Generation darstellen, bestehen sie zu einem Viertel aus wildtypischen Samen. Daher sollten stets mehr Samen untersucht werden, um eine ausreichende Anzahl an Überexpressionspflanzen zu analysieren und um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Hinsichtlich Wurzelwachstum auf 9-HOT wurden die Mixe WRKY32.2, ERF25, ERF30B, Luis A/B, Luis E/F und bZIP untersucht.

3.1.4 Oxylipin-Stress

Um das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen auf verschiedenen Oxylipinen zu untersuchen, wurden die Pflanzen für 5 Tage unter Langtagbedingungen auf 1xMS-Platten angezogen. Im Anschluss daran wurden sie mit Hilfe von Federstahlpinzetten auf Oxylipin-haltige Platten umgesetzt. Für diese Platten wurden die Oxylipine dem noch etwa 60°C warmen, autoklavierten MS-Medium zugesetzt. Die Kontroll-Platten enthielten stets das gleiche Volumen des Lösungsmittels der Oxylipine (Ethanol oder Methanol). Nach weiteren 5 Tagen Wachstum unter Langtagbedingungen wurden die Platten eingescannt und die Wurzellängen analysiert. Dabei wurde nur der Wurzelanteil gemessen, der auf der neuen, Oxylipin-haltigen Platte gewachsen war. Wurden das Wurzelwachstum von β -Estradiol induzierbaren XVE:TF (Überexpression) oder XVE:amiTF (Knockout /-down) untersucht, so wurde die β -Estradiol-Lösung (10 μ M in DMSO) ebenfalls dem autoklavierten 1xMS-Medium zugesetzt. Der Kontrolle wurde in diesem Fall zusätzlich das gleiche Volumen des Lösungsmittels DMSO beigelegt.

3.1.5 Überflutungs-Stress

Für Hypoxia als Stress wurden die Pflanzen unter Wasser gesetzt. Sollte die Transkription bestimmter Gene untersucht werden, so wurden die Pflanzen zunächst für zwei Wochen auf 1xMS-Platten angezogen. Die Platten wurden geflutet und nach den gewünschten Zeitpunkten aus dem Wasser entnommen, die Pflanzen getrocknet und in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Um die Überlebensrate nach Hypoxia zu bestimmen, wurden die Pflanzen zunächst auf Jiffys ausgesät und unter 12h Licht / 12h Dunkel-Bedingungen angezogen. Damit die Tablett schwer

genug sind, um unter Wasser zu bleiben, wurde auf den Tablettboden eine Schicht Kieselsteine mit einem Durchmesser von etwa 0,5 cm gegeben. Darauf wurden die Jiffys gestellt und anschließend mit Draht am Tablett befestigt. Zur Überflutung wurden die Tablett mit den etwa 3 Wochen alten Pflanzen in Wannen mit Wasser gestellt und für weitere 7 Tage im Klimaschrank (12h Licht / 12h Dunkel) inkubiert. Nach der Überflutung wurde das Wasser entfernt und die Pflanzen unter normalen Bedingungen für 2-3 weitere Wochen kultiviert. Nach dieser Regenerationszeit wurde die Überlebensrate bestimmt.

3.1.6 Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformation

Zur stabilen Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde die „Floral dip“ Methode nach Clough und Bent (1998) verwendet. Transgene Agrobakterien wurden in 25 ml YEB-Medium und den benötigten Antibiotika über Nacht (28°C im Schüttler) vorkultiviert. Am nächsten Tag wurde mit dieser Vorkultur 400 ml YEB-Medium (+ Antibiotika) angeimpft und bis zu einer OD600 von ~ 2,0 bei 28°C weiter inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 3000 rpm, 4°C) wurde das Bakterien-Pellet in einer 5 %igen Saccharoselösung mit 0,02 % Silwet resuspendiert und die Bakteriendichte auf OD600 von ~ 0,8 eingestellt. Blühende, in Erde angezogene *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen wurden mit den Blütenständen für etwa 20 sec in diese Bakterienlösung getaucht, anschließend mit Frischhaltefolie umwickelt und weiterhin unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach der Samenreife wurden die Pflanzen getrocknet und die Samen dann von den trockenen Pflanzen geerntet.

3.1.7 Selektion transgener Pflanzen auf Basta®-Resistenz

Um transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen zu selektieren, wurden sie zunächst auf Erde angezogen. Sobald die Pflanzen 2-4 vegetative Blätter besaßen, wurden sie mit 1 mM Basta® besprüht. Dadurch wird die Glutaminsynthetase in den Pflanzen gehemmt, was zum raschen Absterben der behandelten wildtypischen Pflanzen führt. Wurden die Pflanzen mit dem bar-Gen als Resistenzmarker transformiert, sind sie unempfindlich gegenüber Basta® (White et al, 1990). Nach 2-3 Tagen sind die nicht resistenten Pflanzen abgestorben. Die Basta®-Behandlung wird nach 2-3 Tagen wiederholt, um auszuschließen, dass nicht resistente Pflanzen überlebt haben. Die resistenten Pflanzen werden im Anschluss vereinzelt in neue Töpfe gesetzt und weiter kultiviert.

3.1.8 Selektion transgener Pflanzen auf Hygromycin-Resistenz

Hygromycin-Resistenz ist eine weitere Möglichkeit zur Selektion transgener Pflanzen. Sterile Samen wurden dazu auf 1xMS-Medium (kein Zucker, pH 5,7) mit 40 mg/l Hygromycin B einzeln ausgelegt (50 Samen / Platte). Nach 3 Tagen Stratifikation bei 4°C im Dunkeln wurden die Platten für 6-8 h bei RT ins Licht gestellt (Klimaschrank). Nachfolgend wurden die Platten für 3 Tage bei RT im Dunkeln gelagert. Die Hygromycin-resistenten Keimlinge strecken sich und bilden ein verlängertes Hypocotyl aus. Nach weiteren 4-7 Tagen unter Langtag-Bedingungen wurden die resistenten Keimlinge in Erde umgetopft und weiter kultiviert.

3.1.9 Kreuzen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Um die Doppelmutante *erf106xerf107* KO herzustellen, wurden Pflanzen der Einzelmutanten *erf106* und *erf107* miteinander gekreuzt. Dazu wurden von den Mutterpflanzen alle bestehenden Schoten und offene Blüten entfernt. Von den 1-2 ungeöffneten Blüten pro Pflanze wurden die Kelch-, Blüten- und Staubblätter unter dem Binokular abpräpariert. Der verbliebene Fruchtknoten wurde mit reifen Pollenkörnern der Vaterpflanze bestäubt. Die sich daraus entwickelten Samen wurden in der F2-Generation über PCR mit genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primern auf homozygote Pflanzen getestet.

3.1.10 Induktion der Expression durch β -Estradiol

Um das Wurzelwachstum der β -Estradiol induzierbaren Überexpressions-Pflanzen XVE:ERF106 bzw XVE:ERF107 zu analysieren, wurden die Keimlinge nach 4 Tagen Wachstum auf 1xMS-Platten mit 1xMS-Lösung mit 10 μ M β -Estradiol (in DMSO) behandelt. Am nächsten Tag wurden die Keimlinge dann auf neue Platten transferiert, die ebenfalls β -Estradiol und/oder die verschiedenen Oxylipine enthielten. Nach weiteren 5 Tagen wurden die Wurzellängen der Keimlinge analysiert.

3.1.11 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit *Pseudomonas syringae* DC3000

Für die Infektion mit *Pseudomonas syringae* DC3000 wurden die Pflanzen einzeln in Töpfen für vier bis fünf Wochen unter Kurztag- oder 12h Licht/12h Dunkel-Bedingungen angezogen, bis sie eine voll ausgebildete Blattrosette zeigten. Einen Tag vor der Infektion wurden die Pflanzen mit sterilem Wasser besprüht und bis zur Infektion unter Hauben gehalten, um die Feuchtigkeit zu erhöhen und damit eine vermehrte Öffnung der Stomata zu erreichen. Die Bakterien wurden zuvor in LB-Medium

mit entsprechenden Antibiotika für mindestens zwei Tage bei 28°C kultiviert. Nach Zentrifugation wurden das Bakterienpellet zweimal mit steriler MgCl₂-Lösung (10 mM) gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien in so viel MgCl₂-Lösung aufgenommen, bis ein OD₆₀₀ = 1 erreicht war, was 5x10⁸ Bakterienzellen/ml entspricht. Direkt vor der Infektion der Pflanzen wurde 0.04% Silwett L-77 zugegeben. Die Bakterienlösung wurde durch Sprühen gleichmäßig auf den Pflanzen verteilt, sowohl abaxial als auch adaxial. Bis zur Ernte 3h post-Infektion (hpi, Kontrollzeitpunkt) wurden die Pflanzen mit Hauben abgedeckt. Geerntet wurden Blätter drei Stunden und drei Tage nach Infektion. Für eine Probe wurde jeweils ein Blatt von vier verschiedenen Pflanzen derselben Linie vereinigt. Die Blätter wurden für 25sec in Ethanol (70%) und für 30sec in sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden pro Blatt zwei Blattkreise ausgestanzt und mit 100-250µl Wasser versetzt und durch Zugabe von Metallkugeln in der Kugelmühle gemörsert (1,5min bei 200Hz). Von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁵ pipettiert und anschließend je 10 µl auf LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C wurden die Kolonien ausgezählt und analysiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Um DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die Reaktionen wurden mit einer *Taq*-DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*) durchgeführt. Als Template dienten sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA und cDNA.

Komponente	Volumen
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	2,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer 1 (10 µM)	0,5 µl
Primer 2 (10 µM)	0,5 µl
DNA-Template	10-100 ng
H ₂ O	ad 25 µl

Das folgende Thermoprotokoll wurde für die PCR verwendet:

	Zeit	Temperatur °C	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	98	1
Denaturierung	30 sec	98	35
Primerbindung	45 sec	50-64	
Elongation	20-120 sec	72	
Finale Elongation	10 min	72	1
Kühlung	∞	4	1

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau aufzutrennen um ihre Größe zu überprüfen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der Fragment-Größe wurde ein 1-2 %iges Gel mit TAE-Puffer hergestellt und mit 10 µl/ml SERVA DNA Stain G versetzt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versehen und in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente genau bestimmen zu können, wurde zusätzlich zu den Proben ein spezifischer Größenmarker aufgetragen. Für etwa 30 min bei 120 V in einer Kammer mit TAE-Puffer erfolgte die Auftrennung der DNA. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht bei 364 nm detektiert.

3.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte oder anderen Fragmenten aus einem Agarose-Gel zu isolieren wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey Nagel nach dem entsprechenden Protokoll aufgereinigt. Anstelle des beigelegten Puffers erfolgte die Elution der DNA mit Wasser.

3.2.4 Isolation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu isolieren wurde das Nucleospin® Plasmid Kit von Macherey Nagel mit dem zugehörigen Protokoll verwendet. Anstelle des beigelegten Puffers erfolgte die finale Elution der DNA mit Wasser.

3.2.5 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration isolierter Nukleinsäuren wurde mit Hilfe eines Nanodrop 2000 Spektrophotometers gemessen. Diese Bestimmung beruht auf der Exktinktion der Stickstoff-Basen. Eine DNA-Probe mit 50 ng/µl bzw. eine RNA-Probe mit 40 ng/µl zeigt bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm eine optische Dichte (OD) von 1,0. Die Nukleinsäure-Konzentration kann demnach wie folgt berechnet werden:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = E_{260} \times 50 \text{ (DNA) bzw. } 40 \text{ (RNA) } \times \text{Verdünnung}$$

Zur Kalibrierung des Geräts wurde zunächst 1,0 µl des Lösemittels (Wasser) auf den Sensor aufgetragen. Durch Auftragen von je 1,0 µl Probe und photometrische Extinktionsmessung bei $\lambda = 260$ nm wurde der DNA bzw. RNA Gehalt in ng/µl ermittelt.

3.2.6 Gateway™ –Klonierung

Zur Klonierung von DNA Sequenzen wurde der BP-Clonase™ II Enzyme Mix und der LR-Clonase™ II Enzyme Mix von Invitrogen verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde nur ein halber Ansatz je Reaktion verwendet. Zur Erzeugung eines „entry clones“ wurde der Donorvektor pDONR201 verwendet. Anschließend erfolgte eine LR-Reaktion mit 100 ng des zuvor generierten „entry clones“ und 150 ng des „destination vectors“ pMDC7HA. Dadurch wurde ein „expression clone“ generiert, welcher für die stabile Pflanzentransformation geeignet ist.

3.2.6.1 BP-Reaktion

Durch diese Reaktion wird der gewünschte DNA-Abschnitt mit *attB*-sites am Ende in einen Donor-Vektor mit *attP*-sites transferiert. Der BP-Clonase-Enzym-Mix (λ -Integrase + *E.coli Integration Host Factor*) katalysiert die Reaktion. Zur Negativ-Selektion wird das *ccdB*-Gen verwendet.

- 50-150 ng *attB*-PCR-Produkt (oder linearisierter Ziel-Vektor)
- 150 ng Eingangs-Vektor (z.B. pDONR201)
- 2 µl BP-Clonase-Enzym-Mix (Puffer ist enthalten)
- Mit H₂O auf 10 µl auffüllen
- Über Nacht bei 25°C inkubieren
- 1 µl Proteinase K zugeben
- 10 min bei 37°C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes in 100 µl chemisch kompetente DH5 α -*E.coli*-Zellen transformieren

3.2.6.2 LR-Reaktion

Mit Hilfe der LR-Reaktion wird ein DNA-Abschnitt zwischen *attL*-sites eines Eingangsplasmids in einen Ziel-Vektor mit *attR*-sites kloniert. Der LR-Clonase-Enzym-Mix (λ -Integrase + Excisionase + *E.coli Integration Host Factor*) katalysiert die Reaktion. Zur Negativ-Selektion wird das *ccdB*-Gen verwendet.

- 200 ng Eingangs-Vektor

- 200 ng Ziel-Vektor
- 2 µl LR-Clonase-Enzym-Mix (Puffer ist enthalten)
- Mit H₂O auf 10 µl auffüllen
- 2-4 Stunden oder über Nacht bei 25°C inkubieren
- 1 µl Proteinase K zugeben und 10 Minuten bei 37°C inkubieren
- 5 µl des Ansatzes in 100 µl chemisch kompetente DH5α-*E.coli*-Zellen transformieren.

Mittels einer BP-Reaktion kann das DNA-Segment aus dem Ziel-Vektor wieder zurück in einen anderen Eingangs-Vektor transferiert werden.

3.2.7 Transformation von Bakterien

Um *E.coli* zu transformieren wurde ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit der gewünschten Plasmid-DNA versehen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min und erneutes Abkühlen für 3 min auf Eis. Anschließend wurde 500 µl LB-Medium zugesetzt und die Bakterien für mindestens 30 min und leichtem Schütteln (500 rpm) inkubiert. Es folgte das Ausplattieren der Bakterien auf LB-Agar-Platten mit geeigneten Antibiotika und eine Inkubation über Nacht bei 37°C.

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden kompetente Agrobakterien auf Eis aufgetaut und mit 50-100 ng der zu transformierenden DNA vermischt. Der Transformationsansatz wurde in sterile Elektroporationsküvetten (0,2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgte am GenePulser (2,5 kV, 25 µF, 400 kΩ). Nach dem Spannungspuls wurde der Ansatz in einem Reaktionsgefäß mit 2 ml LB-Medium versetzt und für 2 h bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Agrobakterien auf YEB-Selektionsmedium mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.2.8 Kolonie PCR

Der Erfolg der Bakterientransformation wurde mit einer Kolonie-PCR-Durchmusterung bestätigt. Dazu wurde ein Teil der nach Transformation gewachsenen *E. coli* Kolonien in 25 µl Wasser gelöst und 10 µl als Template für eine PCR verwendet.

Bei Agrobakterien wurde ein Teil der Kolonie mit 10 µl NaOH (20 mM) versetzt, für 5 min bei 37°C gelöst und davon 2 µl als Template für die PCR verwendet.

Im Anschluss an die PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die positiven Kolonien zu identifizieren.

3.2.9 Herstellung von Glycerin-Stocks

Zur Lagerung der positiven Bakterienkolonien wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dazu wurden 500 µl einer frischen Übernachtskultur der Bakterien mit 100 µl sterilem Glycerin in einem 2 ml Schraubdeckelgefäß vorsichtig durchmischt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.10 Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Extraktion genomischer DNA wurde Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff weggefroren und aufgemörsert. Nach Zugabe von mindestens 200 µl CTAB-Puffer (Volumen ist an die Materialmenge anzugleichen) erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 15 min. Das gleiche Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde zugegeben und der Ansatz gut gemischt. Eine Zentrifugation von 10 min bei RT und 13000g trennt die hydrophile, wässrige Phase mit der DNA von der hydrophoben Chloroform-Phase. Die hydrophile Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol, invertieren und Inkubation bei RT für 2 min erfolgte die Fällung der DNA. Nach 10 min Zentrifugation bei RT und 10000g wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde entfernt und das Pellet für etwa 2 min bei RT getrocknet bevor es in etwa 50 µl Wasser gelöst wurde.

3.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde extern bei der Firma LGC Genomics durchgeführt. Die verwendete Methode wurde von Sanger *et al.* 1977 entwickelt. Dabei dient einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines neuen DNA-Stranges. Für die Sequenzierungsreaktion werden ebenfalls Primer als doppelsträngige Startsequenz für die DNA-Polymerase I verwendet. Neben Desoxyribonukleotiden werden der Amplifizierung auch Fluoreszenz-markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) zugesetzt. Werden ddNTPs in den neuen DNA-Strang eingebaut, endet das Kettenwachstum, da die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers fehlt. Somit kann keine neue Phosphodiesterbindung entstehen. Gemäß der Statistik wird an jeder Basen-Position je einmal ein Didesoxyribonukleotid eingebaut. Anhand der unterschiedlichen Länge der neu

entstandenen DNA-Stränge kann die Basenabfolge des DNA-Stranges elektrophoretisch bestimmt werden. Mit einem Laser können die unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten ddNTPs der DNA-Stränge nach der Auftrennung in einer Kapillar-Gelelektrophorese-Apparatur detektiert werden.

3.2.12 Extraktion von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Die RNA-Extraktion basiert auf der Eigenschaft der RNA, in der hydrophilen wässrigen Phase in Lösung zu gehen. So kann die RNA von Chlorophyll und anderen Zellbestandteilen getrennt werden, die in der hydrophoben Chloroform-Phase verbleiben. Durch Zugabe der Thiocyanat-Salze werden RNasen inhibiert und die Degradation der RNA während der Extraktion verhindert (Chomczynski, 1993; Chomczynski und Sacchi, 1987). Es wurden etwa 200 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss aufgemörsert. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde das Material mit 1,0 ml Trizol-Puffer versetzt. Nach der Durchmischung der Proben mit Puffer durch Vortexen für 5 min wurde 200 µl Chloroform zugegeben. Dem erneuten Schütteln für weitere 5 min folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für mindestens 30 min. Der wässrige Überstand (etwa 750 µl) wurde in ein neues Gefäß überführt und mit jeweils 250 µl Fällungspuffer und Isopropanol durch invertieren gemischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4°C, 12000 g, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 250 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 5 min bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Nach Abpipettieren des restlichen Ethanols wurde das Pellet für einige Minuten luftgetrocknet und in einem, der Pellet-Größe entsprechenden, Volumen DEPC-H₂O gelöst (etwa 50 µl). Durch Inkubation für 20 min bei RT auf dem Schüttler wurde das Pellet gelöst und die RNA-Konzentration konnte am Nanodrop bestimmt werden.

3.2.13 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde im Anschluss an die Isolation eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Für ein 1%iges Gel wurden 1,5 g Agarose mit 112,5 ml H₂O aufgeköcht und nach Abkühlen auf etwa 60°C mit 15 ml 10x MEN-Puffer und 22,5 ml Formaldehyd (37 %) gemischt. Von den RNA-Proben wurden jeweils 10 µg RNA mit Wasser ad 20 µl und je 10 µl RNA-Probenpuffer gemischt, 10 min bei 65°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gehalten. Als Laufpuffer diente 1x MEN-Puffer. Durch das im Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid konnten die aufgetrennten rRNA Banden im Gel unter UV-Licht bei 364 nm dokumentiert und analysiert werden.

3.2.14 DNase-Verdau, Fällung der RNA, cDNA-Synthese

Um die RNA von restlicher, störender, genomischer DNA zu befreien, wurde ein Verdau mit dem Enzym DNase-I durchgeführt. Dazu wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 8 µl DEPC-behandeltem Wasser mit 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNase-I Enzym (1 U/µl) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach Zugabe von 0,2 µl oligo-dT- und 1 µl Random-Nonamer-Primer wurde der Ansatz bei 70°C für 10 min im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss daran wurden 2 µl dNTPs, 4 µl RT-Puffer sowie 0,25 µl reverse Transkriptase zugegeben und die Proben für 70 min bei 42°C und zum Abstoppen der Reaktion für 10 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde 1:10 mit HPLC-Wasser verdünnt und bis zur Verwendung in der qPCR bei -20°C gelagert.

3.2.15 Quantitative real-time PCR

Um bestimmte Genprodukte zu quantifizieren, wurden 2 µl der verdünnten cDNA in einer 96-well PCR-Platte mit einem Mastermix bestehend aus 10x-Puffer, MgCl₂, dNTPs, SybrGreen und BIOtaq DNA-Polymerase versetzt, zusätzlich zur Mischung der Primer aus forward und reverse Primer. Neben der cDNA der zu untersuchenden Proben wurde als Negativkontrolle Wasser (Reinheitsgrad: für HPLC) verwendet. Als Referenz-Gen für die Quantifizierung wurde Ubiquitin 5 verwendet. Die qRT-PCR wurde in einem CFX-96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler von Biorad durchgeführt. Das PCR-Programm sowie die genaue Zusammensetzung des Mastermixes befinden sich in den nachfolgenden Tabellen.

Komponente	Konzentration	Endkonzentration	Volumen (µl/Rkt.)
10x Puffer Bioline	10x	1x	2,5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1
dNTPs	10 mM	100 µM	0,25
PrimerMix	10x	1x	2,5
SybrGreen Mol Probes 1:1000	10x	0,1x	0,25
BIOtaq DNA-Polymerase	5U/µl	0,25U	0,05
H ₂ O ad 23 µl			16,45
Thermoprotokoll	Zeit	Temperatur (°C)	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung	15 sec	95	45
Primerbindung	20 sec	58	
Elongation	20 sec	72	
Messung	3 sec	79	
Finale Denaturierung	10 sec	95	1
Schmelzkurve		65-95 (in 0,5er Schritten)	1

3.2.16 RNAseq-Transkriptom-Analyse

Die Proben für die Transkriptom-Analyse wurden aus 2 Wochen alten Keimlinge gewonnen. Diese wurden aus zwei Wochen alten Keimlingen nach 4 Stunden Behandlung (10 μ M β -Estradiol für die Überexpression von ERF106 bzw. ERF107 oder Überflutung für das Hypoxia-Experiment) gewonnen. Durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff wurden das Material geerntet und im Anschluss die RNA mit Trizol extrahiert. Vor der Durchführung des NEBNext-Protokolls wurde die RNA einem DNase-I-Verdau unterzogen, um DNA-Reste zu entfernen. Die Qualität der RNA nach diesem Schritt wurde durch eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 5 μ g RNA eingesetzt. Für die Isolation und Fragmentierung der gesamten RNA wurden je nach Verfügbarkeit 2-3 μ g DNase-I-verdaute RNA eingesetzt. Die Isolation der mRNA wurde mit *Sera-Mag Magnetic Oligo (dT) Particles* (2815-2103, ThermoScientific, Deutschland) durchgeführt. Die cDNA-library wurde unter Verwendung des *NEBNext mRNA Library Prep Master Mix Set for Illumina* (#E7335, New England BioLabs) hergestellt. Um die Effizienz der First Strand cDNA Synthese zu verbessern, wurde der 42°C-Schritt (in 2.) auf 50 min verlängert. Bei der abschließenden PCR zur Anreicherung der Library wurden die Amplifikationsschritte 15mal wiederholt. Im Anschluss an die Library-Präparation erfolgte die Qualitätskontrolle am *Experion Automated Electrophoresis System* von Biorad unter Verwendung des *Experion RNA HighSens Analysis Kit* und *Experion DNA Chips* (700-7163, BIORAD, Deutschland). Eine *library* setzte sich aus 12 Proben zusammen, für die Sequenzierung wurde eine *library* auf 2 Messspuren aufgeteilt. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde an einem *Illumina GAIIx* Gerät nach Anweisungen durchgeführt. Die Qualitätskontrolle der Sequenzierungsdaten erfolgte mit *fastQC*, die Zuordnung der Mess-Daten mit Bowtie 0.12.8 (Langmead & Salzberg, 2012) auf Basis des *Arabidopsis thaliana*-Genoms TAIR9. Für die Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde das Programm R mit *GenomicRanges* (Lawrence *et al*, 2013), *Rtracklayer* (Lawrence *et al*, 2009), *samtools* und *edgeR* (Robinson *et al*, 2010) verwendet. Nur Gene mit pAdjust („BH“ Korrektur) $\leq 0,01$ wurden für die weiteren Analysen herangezogen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Proteine aus Pflanzenmaterial wurden durch Extraktion mit Harnstoffextraktionspuffer gewonnen. Dazu wurde das Material unter flüssigem Stickstoff aufgemörsert. Von diesem gefrorenen Pulver wurden 50-200 mg in ein Reaktionsgefäß gegeben und, je nach Menge, mit 150-300 μ l Harnstoffextraktionspuffer versetzt und gut durchmischt. Nach 10 min Inkubation bei 80°C im Thermomixer wurden die Proben für 10 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteinextrakte bei -20°C oder -80°C gelagert. Bevor die Proben in der SDS-PAGE analysiert wurden, erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 5 min.

3.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE (Laemmli, 1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Nachfolgend die benötigten Volumina für eine Standard-SDS-PAGE.

Komponente	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O	6,6 ml	3,4 ml
Acrylamidmix 30%	8,0 ml	0,38 ml
Tris-Puffer, pH 8.8, 1,5 M	5,0 ml	0,63 ml
SDS 10%	0,2 ml	0,05 ml
APS 10%	0,2 ml	0,05 ml
TEMED	0,008 ml	0,005 ml

Nach Einspannen des Gels in die Elektrophorese-Apparatur und Überschichten mit Laufpuffer wurden die Geltaschen mit je 40 µl Proteinextrakt befüllt. Um leere Taschen zu vermeiden wurden sie gegebenenfalls mit Harnstoffextraktionspuffer versehen. Im Anschluss erfolgt der Gellauf bei 140 V für etwa 2-4 Stunden.

3.3.3 Proteintransfer mittels Semi-Dry-Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Dieser Transfer erfolgte mittels der „Semi-Dry-Blotting“-Methode (Kyhse-Andersen, 1984). Drei Lagen Fließpapier wurden mit Transferpuffer angefeuchtet und auf die Blottingapparatur gelegt. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol aktiviert, anschließend in Transferpuffer equilibriert und luftblasenfrei auf das Fließpapier gelegt. Das SDS-Gel wurde auf dem Filter positioniert und mit drei weiteren Lagen in Transferpuffer equilibriertem Fließpapier bedeckt. Der Elektrotransfer erfolgte für 1 Stunde bei 1 mA/cm² Filterfläche. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran entweder getrocknet oder direkt weiterverwendet. Eine getrocknete Membran wurde vor der Immunodetektion erneut in Methanol aktiviert.

3.3.4 Immunodetektion

Die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden zunächst mit einem Primärantikörper immunodetektiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop des nachzuweisenden Proteins. Der Primärantikörper wurde dann von einem zweiten Antikörper erkannt. Dieser

Sekundärantikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt, die durch Oxidation des Substrates Luminol zur detektierbaren Chemilumineszenz führt. Der Nachweis der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe eines Röntgenfilms oder dem ChemiDoc MP Imaging System (Biorad). Zum Absättigen der freien Stellen auf der Membran (=Blocken) erfolgte zunächst eine Inkubation von 1 Stunde mit 5% Milchpulver in TBS-T bei Raumtemperatur. Für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wurde die Membran mit dem Primärantikörper in 1% Milchpulver in TBS-T inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 5 min in 1x TBS-T wurde nicht gebundener Primärantikörper entfernt. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (in TBS-T und 1% Milchpulver) dauerte 2 Stunden bei Raumtemperatur. Durch 5x5 min Waschen mit 1x TBS-T wurde der nicht gebundene zweite Antikörper eliminiert. Die Membran wurde mit der Proteinseite nach oben auf eine Folie gelegt und für 5 min mit dem ECL-Substratmix inkubiert. Dieser Mix wurde immer frisch aus Lösung A + Lösung B angesetzt, bei dem verwendeten Produkt im Verhältnis 1:1. Nach Entfernen des Substratmixes wurde eine zweite Folie luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte je nach Signalstärke für wenige Sekunden bis zu einer Stunde.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung von Unterschieden zwischen Wildtyp und verschiedenen Mutantpflanzen erfolgte mit dem studentischen t-Test unabhängiger Stichproben (Abb. 4.1, 4.2, 4.4, 4.6, 4.7, 4.9, 4.19, 4.22). Die Signifikanzniveaus werden mit $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ oder $***p \leq 0,001$ angegeben. Grundsätzlich wurde mit dem t-Test die Kontrolle auf Kontrollbedingungen mit den anderen untersuchten Proben bzw. mit den anderen untersuchten Bedingungen verglichen (z.B. Col-0 Kontrolle = 100%). In Abhängigkeit von der Proben-Anzahl wurde die Standardabweichung (STABW) oder der Standardfehler (SE) berechnet.

Die statistische Auswertung mit Varianzanalysen (ANOVA) und darauf folgendem Bonferroni post-hoc-Test wurde mit Hilfe der Datenanalyse- und Grafiksoftware Origin durchgeführt (Abb. 4.8. und Abb. 4.14). Aufgrund der stark unterschiedlichen Induktionen sind nach dem Levene-Test für die Gene ASA1, CYP79B3, CYP83B1, CYP71A12, CYP71A13, GSTF6 und PAD3 die Varianzen der Grundgesamtheit bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ signifikant unterschiedlich (Abb. 4.14). Die Aussagen der ANOVA sind daher nur zu 99% zuverlässig.

4 Ergebnisse

Es ist bekannt, dass Oxylipine wie Jasmonsäure, OPDA oder 9-HOT das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen hemmen (Taki *et al*, 2005; Velloso *et al*, 2007). Die genauen Mechanismen sind derzeit jedoch noch nicht vollständig geklärt. Da TF in allen Lebewesen an den meisten regulatorischen Wegen beteiligt sind, ist anzunehmen, dass sie auch in Oxylipin-vermittelten Reaktionen eine Rolle spielen. In *Arabidopsis thaliana* gibt es mehr als 2000 TF (Davuluri *et al*, 2003; Guo *et al*, 2005; Iida *et al*, 2005; Riaño-Pachón *et al*, 2007). Einige von ihnen sind bislang sehr intensiv erforscht, während es von anderen TF nahezu keine Informationen gibt. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von TF, die an pflanzlichen Antworten auf Oxylipine mitwirken.

4.1 Screening der *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor- Überexpressionssamenbank auf erhöhte Resistenz gegenüber dem Oxylipin 9-HOT

4.1.1 *Proof-of-Principle*: Überexpression von TF verbessert das Wurzelwachstum auf 9-HOT

Von den TF TGA2, TGA5 und TGA6 ist bekannt, dass sie an der Xenobiotika-induzierten Signalantwort beteiligt sind, insbesondere nach Lipid-Stress durch Phytoprostan-Behandlung (Stotz *et al*, 2013; Köster *et al*, 2012). Für diese Arbeit wurde angenommen, dass Überexpression von (TGA-) TF auch die Signaltransduktion nach 9-HOT-Stress beeinflusst. Dies kann durch Aktivierung der Detoxifikation von 9-HOT oder auch durch Induktion einer generellen Stressantwort vermittelt werden. Die Behandlung mit 9-HOT führt zu einem verkürzten Wurzelwachstum bei Wildtyp-Pflanzen. Es ist daher anzunehmen, dass eine zu hohe Dosis 9-HOT toxisch wirkt. TF können dann beispielsweise Gene induzieren, die 9-HOT metabolisieren und so den Stress für die Pflanze reduzieren. So könnten TF zu einer Verbesserung des Wurzelwachstums auf 9-HOT beitragen. Um diese Hypothese hinsichtlich TGA TF zu überprüfen, wurden verschiedene *tga*-Mutanten hinsichtlich ihres Wurzelwachstums auf besagtem Oxylipin untersucht. Zum einen die Dreifach-Mutante *tga256*, zum anderen die Komplementationslinien für TGA5 und TGA2 im Dreifach-Mutanten-Hintergrund (*tga256* 35S:TGA5 bzw. *tga256* 35S:TGA2). Abbildung 4.1 bestätigt die Hypothese. Die *tga256* 35S:TGA5 Keimlinge zeigen sowohl auf 19 μ M als auch auf 23 μ M 9-HOT ein, verglichen mit *tga256*, signifikant verbessertes Wurzelwachstum. Die TGA2-Komplementationslinie *tga256* 35S:TGA2 dagegen zeigt hier keine Veränderung im Vergleich zu *tga256*.

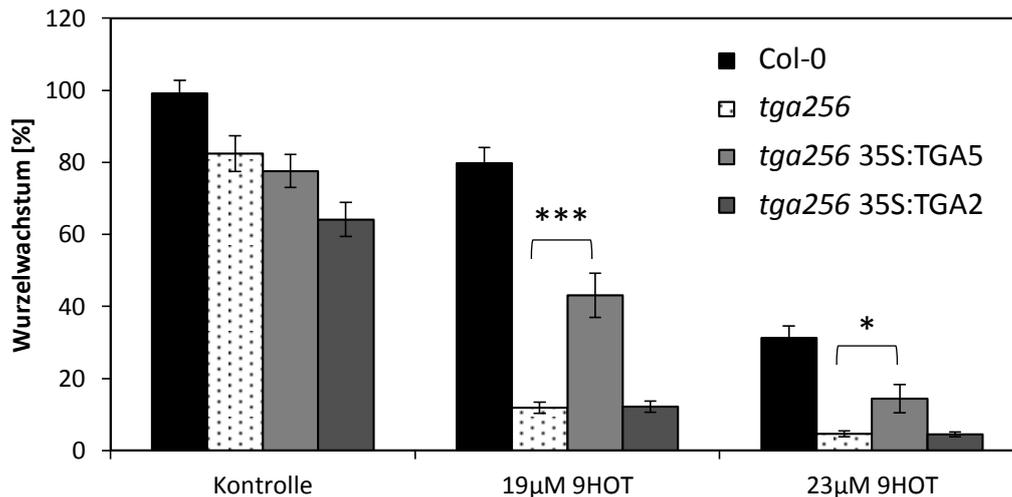


Abbildung 4.1 TGA5 verbessert das Wurzelwachstum auf 9-HOT. Wurzelwachstum von Wildtyp Col-0 und den Mutanten *tga256*, *tga256* 35S:TGA5 und *tga256* 35S:TGA2 auf 9-HOT. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf Kontrollmedium, 19µM oder 23µM 9-HOT analysiert. Das Wachstum von Col-0 auf Kontrollmedium wurde gleich 100% gesetzt, die Wurzellängen auf 9-HOT sowie der verschiedenen Linien in Relation zu Col-0 auf Kontrollmedium. Die statistische Analyse vergleicht die Mutanten *tga256* 35S:TGA5 und *tga256* 35S:TGA2 mit der Tripel-Mutante *tga256* unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, $n \geq 22$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch).

Ein direktes Ziel-Gen der TGA-TF ist *CYP81D11* (Fode *et al*, 2008). In der Literatur wird allgemein angenommen, dass dieses Cytochrom P450, wie die anderen Proteine dieser Genfamilie, an der Detoxifizierung von verschiedenen Xenobiotika beteiligt ist (Denison & Whitlock, 1995). Durch Behandlung mit verschiedenen Oxylipinen (Phytoprostane, OPDA) oder Xenobiotika (Trinitrotoluol, 2-Benzoxazolinon) wird die Transkription von *CYP81D11* aktiviert (Mueller *et al*, 2008; Ekman *et al*, 2003; Baerson *et al*, 2005). Das Wurzelwachstum auf 9-HOT wurde in der *gain-of-function* (Funktionsgewinn) 35S:CYP81D11 Pflanze und in der *loss-of-function* (Funktionsverlust) Mutante *cyp81d11* untersucht. Vermehrte Expression von *CYP81D11* führt zu einer signifikanten Verbesserung des Wurzelwachstums auf 9-HOT (Abbildung 4.2), während die Mutante in gleichem Ausmaß wie der Wildtyp Col-0 gehemmt wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wachstum inhibierende Wirkung von 9-HOT durch vermehrte Expression eines TF, wie hier TGA5, verringert werden kann. Die Pflanzen mit einem höheren Gehalt des TF wachsen, vermutlich durch die vom TF ausgelöste Veränderung der Genregulation, besser auf 9-HOT. Zudem wurde erstmals derselbe Effekt durch Überexpression des potentiellen Detoxifizierungs-Gens *CYP81D11* erreicht werden. Gewöhnlich sind an einem Signalweg mehrere TF beteiligt. Daher ist der nächste Schritt die Identifikation von weiteren TF, die das Wurzelwachstum auf 9-HOT verbessern.

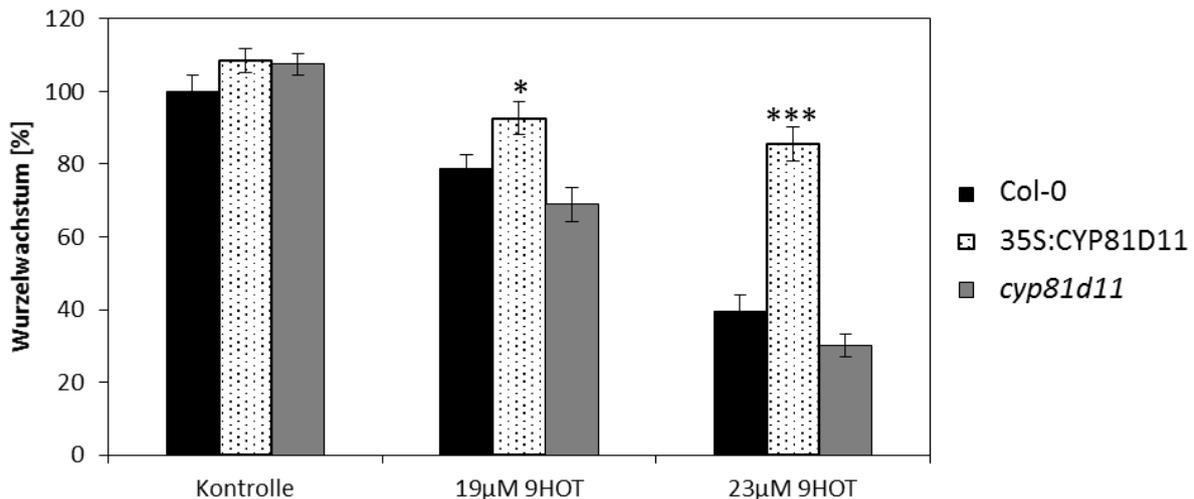


Abbildung 4.2 CYP81D11 verbessert das Wurzelwachstum auf 9-HOT. Wurzelwachstum von Wildtyp Col-0, 35S:CYP81D11 und der Mutante *cyp81d11* auf 9-HOT. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf 1xMS-Kontrolle, 19µM oder 23µM 9-HOT analysiert. Das Wachstum von Col-0 auf Kontrollmedium wurde gleich 100% gesetzt, die Wurzellängen auf 9-HOT sowie der verschiedenen Linien in Relation zu Col-0 auf Kontrollmedium. Die statistische Analyse vergleicht die Mutanten mit der Kontrolle Col-0 unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, $n \geq 47$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch).

4.1.2 Durchmusterung der *At*TORF-Ex-Kollektion hinsichtlich Wurzelwachstums auf dem Oxylin 9-HOT

Die vorangegangenen Analysen haben gezeigt, dass Überexpression eines TF das Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT signifikant verbessern kann. Um weitere TF zu identifizieren, die diesen Effekt zeigen, wurde die *At*TORF-Ex-Kollektion verwendet. Dabei handelt es sich um eine Kollektion verschiedenster 35S:TF-Linien, siehe Einleitung Abb.1.4 (Weiste *et al*, 2007). Die nachfolgende Abbildung 4.3 veranschaulicht die dabei verwendete Vorgehensweise. Die Kontrolle zeigt das natürliche Wachstum von Col-0. Durch Zugabe von 9-HOT kommt es zu einer stark verkürzten Wurzel beim Wildtyp, aber auch bei den meisten Pflanzen der *At*TORF-Ex-Kollektion. Die Pflanzen, die ein deutlich verlängertes Wurzelwachstum auf 9-HOT zeigten (in Abb. 4.3 (A) pink markiert und nachfolgend als Kandidaten bezeichnet), wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften genauer analysiert. Dazu erfolgte eine PCR zur Identifikation des TF in den jeweiligen 35S:TF-Linien, die Bindestellen der verwendeten Primer sowie die *At*TORF-Ex-Kassette sind in Abbildung 4.3 (B) dargestellt. Die untersuchten Sammlungen enthielten mehrheitlich TF aus den Gruppen bZIP, ERF, bHLH, MYB, NAC und WRKY. Insgesamt wurde das Wurzelwachstum von 6087 Pflanzen auf 9-HOT untersucht. Davon zeigen 201 Pflanzen (3,3 %) ein verbessertes Wurzelwachstum (Abbildung 4.3 (C)), was eine hohe Stringenz des Experiments zeigt. Die Konzentration von 25 µM 9-HOT ist demnach hoch genug, um die Anzahl der erhaltenen Kandidaten einzuschränken. Die Zahl unspezifischer Funde ist dadurch gering.

Folglich wird angenommen, dass die Häufigkeit, mit der ein TF als Kandidat in diesem Versuch gefunden wurde, in direktem Zusammenhang mit seiner Bedeutung in Oxylin-vermittelten Signalwegen steht.

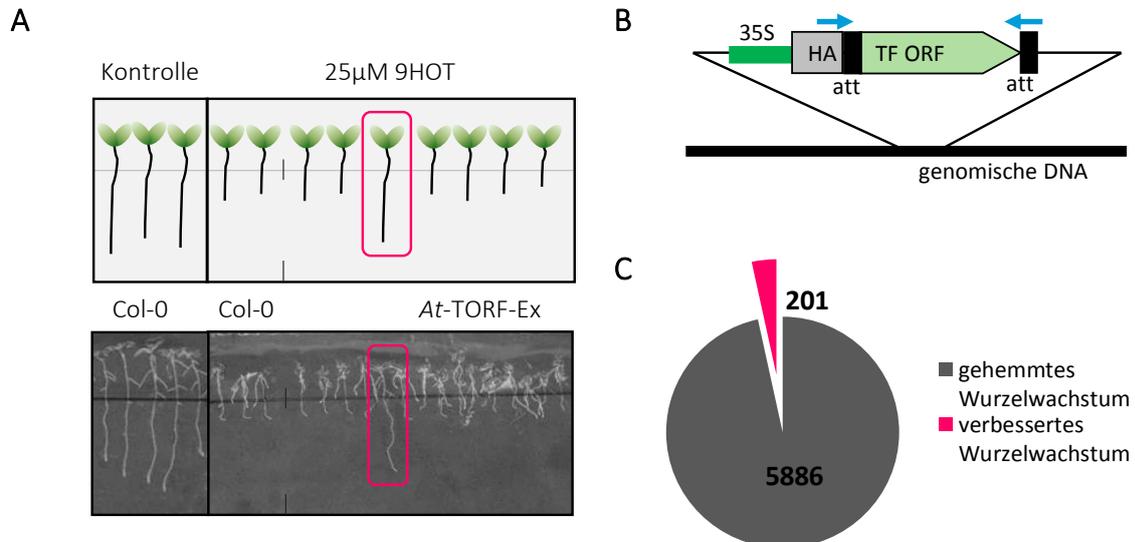


Abbildung 4.3 Durchmusterung der *AtTORF-Ex*-Kollektion hinsichtlich des Wurzelwachstums auf 9-HOT. (A) Schematische Darstellung der Durchmusterung (oben). Unten ist beispielhaft das Wurzelwachstum von Col-0 auf der Kontrolle (links) sowie das Wachstum von Col-0 und Pflanzen aus der *AtTORF-Ex*-Kollektion auf 25µM 9-HOT gezeigt (rechts). Pink markiert sind die Kandidaten mit langer Wurzel auf 9-HOT. (B) Schematische Darstellung der in die genomische DNA integrierten *AtTORF-Ex*-Kassette, bestehend aus 35S-Promotor (grün), HA-Tag (grau), att-Sequenzen der für das Gateway©-System benötigte Attachmentsites (schwarz) und TF-ORF Sequenz (hellgrün). Die blauen Pfeile zeigen die Bindestellen der für die PCR verwendeten Primer zur Identifikation des TF. (C) Analyse der getesteten Pflanzen aus der *AtTORF-Ex*-Kollektion. Von 6087 auf 9-HOT untersuchten Pflanzen wurde bei 201 Pflanzen (3,3 %) ein verbessertes Wurzelwachstum beobachtet (pink).

Nachfolgende Tabelle 4.1 zeigt daher nur diejenigen TF, die dreimal oder häufiger mit verbessertem Wurzelwachstum auf 9-HOT identifiziert wurden. Eine vollständige Liste aller gefundenen TF befindet sich im Anhang (Tabelle 8.1).

Tabelle 4.1 Kandidaten aus der Durchmusterung der *AtTORF-Ex*-Kollektion hinsichtlich verbessertem Wurzelwachstum auf 9-HOT. Aufgelistet sind Transkriptionsfaktoren, die dreimal oder häufiger gefunden wurden.

At-Nummer	Häufigkeit	TF-Familie	Bezeichnung
At5g07580	5x	ERF	ERF 106
At5g61590	5x	ERF	ERF 107
At1g31630	5x	MADSbox	AGL86
At4g34590	4x	bZIP	bZIP 11
At2g18160	3x	bZIP	bZIP2
At1g68880	3x	bZIP	bZIP8
At4g36730	3x	bZIP	bZIP41
At1g48150	3x	MADSbox	

Dreimal wurden die bZIP TF bZIP2, bZIP8 und bZIP41 sowie der MADSbox-TF (At1g48150) gefunden, viermal der TF bZIP11. Die bZIP TF sind nahe miteinander verwandt und sind der Gruppe S zuzuordnen (Jakoby *et al*, 2002). Am häufigsten (fünfmal) wurden der in der Literatur bislang unbekannte MADSbox TF AGL86 gefunden, sowie die beiden ERF TF ERF106 und ERF107. Da die Charakterisierung von TF sehr langwierig ist, konnten nicht alle gefundenen Kandidaten weiter betrachtet werden. Für die genaueren Analysen wurden zunächst bZIP11, ERF106 und ERF107 ausgewählt.

4.1.2.1 Analyse des Wurzelwachstums von bZIP11 Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Pflanzen auf dem Oxylipin 9-HOT

Der TF bZIP11 wurde in der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion auf 9-HOT viermal mit deutlich verbessertem Wurzelwachstum gefunden. Für diese Sammlung wurden die TF in einem 35S-Promotor:TF-Konstrukt in den Wildtyp Col-0 transformiert. Eine vermehrte Expression des TF ist zu erwarten. Von bZIP11 ist bekannt, dass Überexpression zu einem massiv verringerten Wachstum führt, sowohl von der Wurzel, als auch der gesamten Pflanze (Hanson *et al*, 2008). Daher wurde zunächst die Genexpression von bZIP11 in drei der vier gefundenen Kandidaten untersucht. Abbildung 8.1 zeigt die Expression von bZIP11 in der Kontrolle Col-0 im Vergleich zu jeweils fünf Pflanzen jeder Linie. Eine signifikant vermehrte Expression findet in keiner der getesteten Pflanzen statt. Die in der Durchmusterung gefundenen Kandidaten zeigen, entgegen der Erwartung, eine Suppression von bZIP11, da vermehrte Expression von bZIP11 das Wachstum der Pflanzen stark einschränken würde (Hanson *et al*, 2008). Um diese Hypothese zu überprüfen, werden Funktionsgewinn- und Funktionsverlustmutanten von bZIP11 untersucht. Im Gegensatz zur konstitutiven Überexpression von Proteinen greift die induzierbare Expression von TF nicht dauerhaft in die Transkription der Pflanzen ein. Unter Verwendung eines für die Pflanze fremden Stoffes kann die Expression eines gezielten Gens chemisch aktiviert werden. Ein solches System ist das β -Estradiol-induzierbare System (XVE) (Zuo *et al*, 2000). Durch Zugabe von β -Estradiol, einem dem Östrogen ähnlichen Stoff und fremd für *Arabidopsis*, kann die Expression des gewünschten Gens gezielt aktiviert oder durch Expression von *artificial micro RNA* (amiRNA) gezielt reprimiert werden (Zuo *et al*, 2000). Neben bZIP11 wurden auch bZIP2 und bZIP44 in der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion gefunden. Diese drei TF gehören zur Gruppe S1, einer Untergruppe der Gruppe S bZIP TF (Ehlert *et al*, 2006; Jakoby *et al*, 2002). Da bereits gezeigt wurde, dass bZIP TF in manchen Funktionen redundant sind, wurde eine Dreifachmutante von bZIP2/bZIP11/bZIP44 verwendet (Weiste & Dröge-Laser, 2014). Um das verbesserte Wurzelwachstum von Pflanzen mit supprimierten bZIP11-Spiegeln zu verifizieren, wurden nachfolgend die β -Estradiol induzierbaren Linien XVE:amibZIP2/bZIP11/bZIP44 als Funktionsverlust- und XVE:bZIP11 als Funktionsgewinn-Mutanten mit den Leervektor-Pflanzen verglichen (Abbildung 4.4). Durch Zugabe

von β -Estradiol und dadurch vermehrter Expression von bZIP11 wird das Wurzelwachstum in XVE:bZIP11 signifikant gehemmt. Das Wachstum von Col-0 wird von β -Estradiol nicht beeinflusst, Zugabe von 9-HOT jedoch führt zu einer signifikanten Hemmung des Wurzelwachstums. Verglichen mit Col-0 ist das Wachstum der XVE:ami bZIP2/bZIP11/bZIP44-Pflanzen auf 9-HOT signifikant erhöht, das der XVE:bZIP11-Pflanzen signifikant geringer. Wie in der Durchmusterung zeigt sich hier eine Verbesserung des Wurzelwachstums bei Pflanzen mit geringeren bZIP11-Spiegeln.

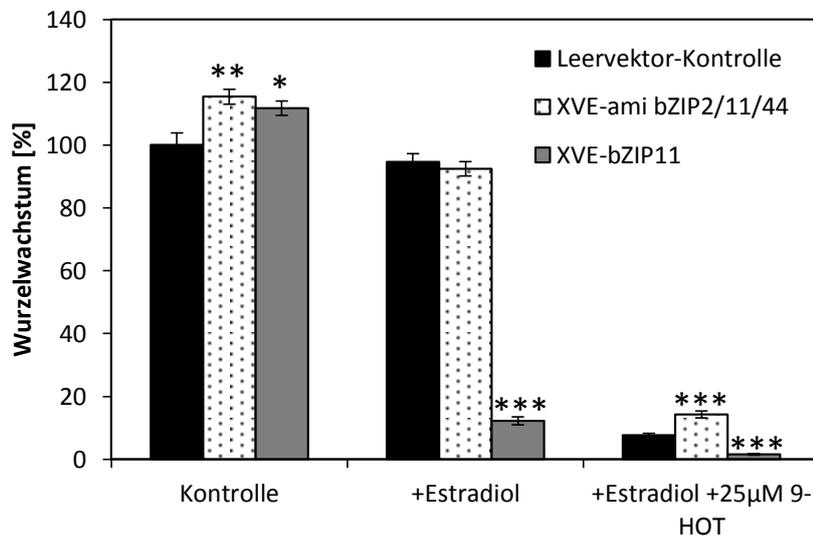


Abbildung 4.4 Mutation von bZIP2/bZIP11/bZIP44 verbessert das Wurzelwachstum auf 9-HOT. Wurzelwachstum der Leervektor-Kontrolle, XVE:ami bZIP2/bZIP11/bZIP44 und XVE:bZIP11 auf 9-HOT. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf der Kontrolle (1xMS), 1xMS + β -Estradiol oder 1xMS + β -Estradiol +25 μ M 9-HOT analysiert. Das Wachstum der Leervektor-Kontroll-Pflanzen auf Medium ohne 9-HOT wurde gleich 100% gesetzt, die Wurzellängen auf 9-HOT sowie der verschiedenen Linien in Relation zu den Leervektor-Pflanzen auf Kontrollmedium. Die statistische Analyse vergleicht die XVE-Linien mit der Leervektor-Kontrolle unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, $n \geq 63$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Es konnte demnach erfolgreich gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von bZIP11 ein verbessertes Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT zur Folge hat. Das Ergebnis aus der Durchmusterung konnte demnach ebenfalls bestätigt werden. Der Zusammenhang zwischen bZIP11 und dem verbesserten Wachstum der Pflanzen mit geringeren bZIP11-Spiegeln auf dem Oxylin 9-HOT erschließt sich möglicherweise aus den Zielgenen. Um wissenschaftliches Neuland zu betreten, erfolgte die detaillierte Beschreibung letztendlich nur von ERF106 und ERF107.

4.1.2.2 Analyse des Wurzelwachstums von ERF106 und ERF107 Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten auf 9-HOT

Die beiden TF ERF106 und ERF107 wurden jeweils fünfmal in der Durchmusterung der *At*TORF-Ex Kollektion gefunden. Beide gehören zur Gruppe IX der *Arabidopsis* ERF-Gene und sind sehr nahe miteinander verwandt (Abbildung 4.5 (Nakano *et al*, 2006)). Durch die nahe Verwandtschaft ist auf eine ähnliche Funktion zu schließen. Das Wurzelwachstum auf 9-HOT ist durch die Überexpression von ERF106 bzw. ERF107 sehr reproduzierbar. In den 35S-ERF106-Pflanzen aus der *At*TORF-Ex-Kollektion wurde ein N-terminal verkürztes ERF106 transformiert.

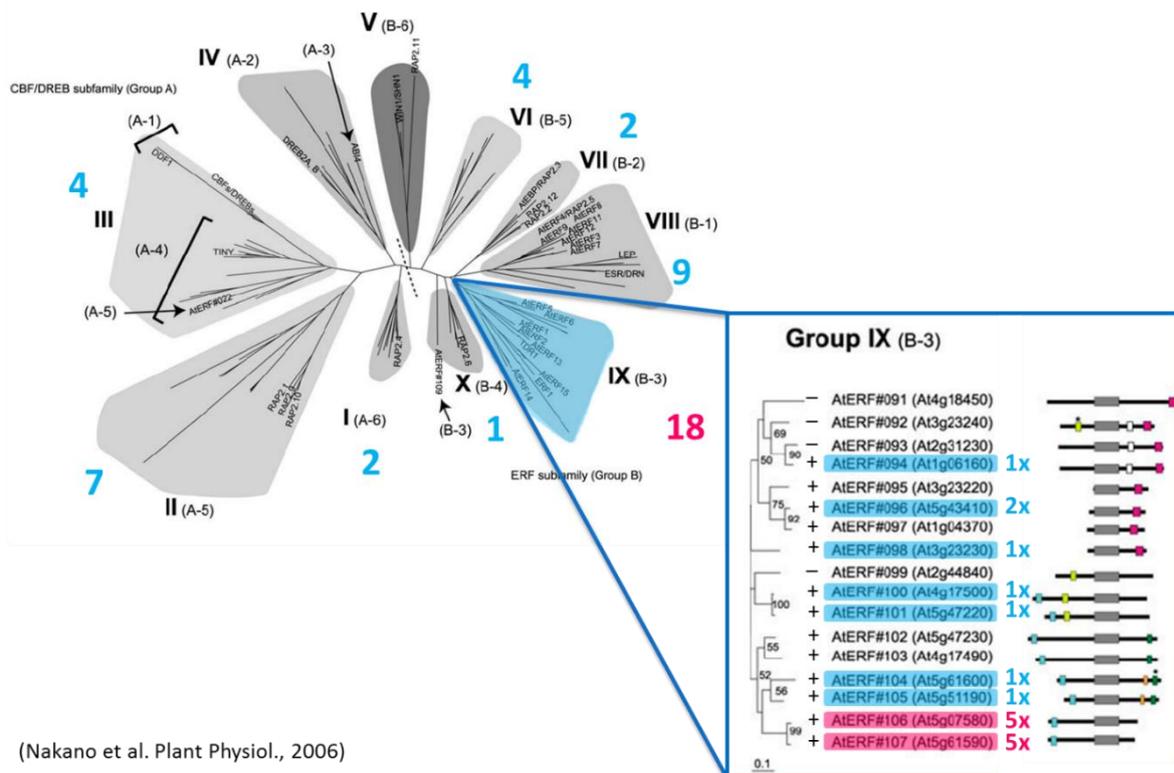


Abbildung 4.5 Phylogenetische Darstellung der Familien der ERF TF aus *Arabidopsis thaliana*, basierend auf der Ähnlichkeit der Proteinstrukturen. Die Anzahl an TF, die bei der Untersuchung der *At*TORF-Ex-Kollektion auf 9-HOT mit verbessertem Wurzelwachstum identifiziert wurden, ist mit blau bzw. pink notiert. TF der Gruppe IX wurden am häufigsten gefunden. Die pinke Markierung zeigt die beiden TF ERF106 (At5g07580) und ERF107 (At5g61590). Modifiziert nach Nakano *et al*, 2006.

Zur Verifizierung des verbesserten Wurzelwachstums auf 9-HOT wurden daher die β -Estradiol-induzierbaren Funktionsgewinn-Mutanten XVE:HA-ERF106 bzw. XVE:HA-ERF107 mit den Volllängengenen transformiert. Das XVE-System bietet den Vorteil, dass erst durch β -Estradiol-Gabe die Überexpression des TF gezielt angeschaltet wird, und ein dauerhafter Eingriff in die Signaltransduktion durch konstitutive Überexpression vermieden wird. Um die transgenen Proteine im Western Blot analysieren zu können, wurde N-terminal eine kurze Aminosäuresequenz des Hämagglutinin (HA),

einem Glykoprotein des Influenza-Virus eingebracht. Anhand spezifischer Antikörper, die nur an diesen HA-tag binden, erfolgt die Detektion im Western Blot.

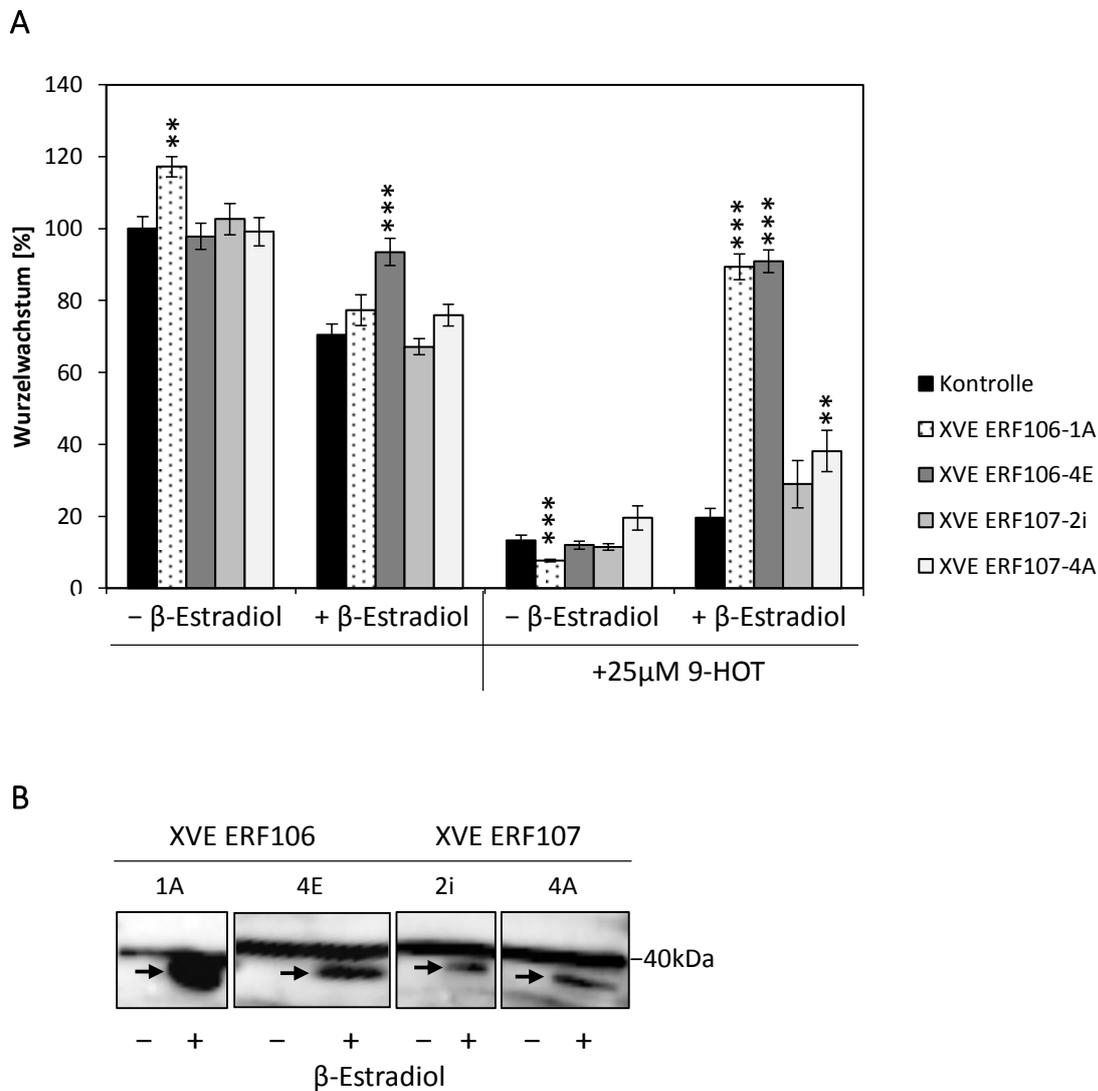


Abbildung 4.6 Überexpression von ERF106 oder ERF107 verbessert das Wurzelwachstum auf 9-HOT.

(A) Wurzelwachstum von Kontrolle und den β -Estradiol-induzierbaren Funktionsgewinn-Mutanten XVE:ERF106-1A und -4E sowie XVE:ERF107-2i und -4A auf 9-HOT. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf 1xMS-Kontrolle und 1xMS + β -Estradiol, ohne und mit 25 μ M 9-HOT analysiert. Das Wachstum der Leervektor-Kontrollpflanzen auf Kontrollmedium wurde gleich 100% gesetzt, die Wurzellängen auf 9-HOT sowie der verschiedenen Linien in Relation zu den Leervektor-Pflanzen auf Kontrollmedium. Die statistische Analyse vergleicht die XVE-Linien mit der Kontrolle unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, $n \geq 22$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt. (B) Western Blot zum Nachweis über die vermehrte Expression von HA-ERF106 bzw. HA-ERF107 mit α -HA-Antikörper in den Linien XVE:ERF106-1A und -4E sowie XVE:ERF107-2i und -4E. Die Pfeile markieren die spezifischen Banden für HA-ERF106 und HA-ERF107.

Abbildung 4.6 (A) zeigt eine deutliche Reduktion des Wurzelwachstums nach Zugabe von 9-HOT für alle untersuchten Linien ohne β -Estradiol-Zugabe. Wurde nur β -Estradiol in die 1xMS-Platten gegeben, sind die Wurzellängen im Vergleich zur Kontrolle leicht verkürzt. Durch β -Estradiol-Behandlung und daraus resultierender vermehrter Expression von *ERF106* (Abbildung 4.6 (B)) wird für beide Linien, XVE:ERF106-1A und -4E, eine signifikante Verbesserung des Wurzelwachstums beobachtet. Im Fall von *ERF107* zeigt sich nur für die Linie XVE:ERF107-4A ein signifikant verbessertes Wachstum auf 9-HOT. Das korreliert mit den im Western Blot detektierten geringeren Protein-Mengen für HA-ERF107 (Abbildung 4.6 (B)). Für alle weiteren Experimente wurden daher die Linien XVE:ERF106-4E und XVE:ERF107-4A verwendet.

Da gezeigt wurde, dass die Überexpression von *ERF106* und *ERF107* das Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT signifikant verbessert, sollen im Gegenzug auch die Funktionsverlustmutanten *erf106* und *erf107* analysiert werden. Dadurch kann untersucht werden, ob der Verlust der TF zu phänotypischen Auswirkungen z.B. hinsichtlich des Wachstums auf 9-HOT führt. Aufgrund der sehr nahen Verwandtschaft von *ERF106* und *ERF107* ist eine funktionale Redundanz möglich. Um dies ausschließen zu können, wurden die Funktionsverlust-Mutanten *erf106* und *erf107* gekreuzt, um die Doppelmutante *erf106xerf107* zu erhalten. Abbildung 4.7 (A) zeigt die Lage der T-DNA-Insertionen in den verwendeten Mutanten. Bei beiden TF-Genen liegt die Insertion am 3'-Ende des Exons. Abbildung 4.7 (B) zeigt spezifische Banden sowohl für *ERF106* als auch für *ERF107* unter Verwendung des T-DNA-spezifischen Primers LBa1 und den Gen-spezifischen Primern. Da sowohl in der Kombination LBa1+LP als auch LBa1+RP Banden vorhanden sind, ist von einer mehrfachen Insertion der T-DNA am Integrationsort auszugehen. Die genspezifischen Banden für *ERF106* und *ERF107* im Wildtyp Col-0 werden nur bei der Primerkombination LP+RP amplifiziert. In der Mutante sind diese Banden für beide Gene nicht detektierbar. Somit wurde die Homozygotie der Doppelmutante durch Analyse der genomischen DNA mit Hilfe von Gen-spezifischen Primern nachgewiesen. Um den Verlust der TF auch auf transkriptioneller Ebene zu überprüfen, wurde die Expression von *ERF106* und *ERF107* mit Hilfe der qRT-PCR analysiert (Abbildung 4.7 (C)). Im Wildtyp Col-0 werden beide TF nach 4h Hypoxia-Stress verstärkt exprimiert. Betrachtet man *erf106* so ist nur die Expression von *ERF107* detektierbar, bei *erf107* ist es umgekehrt, und in der Doppelmutante *erf106xerf107* sind beide TF nicht nachweisbar.

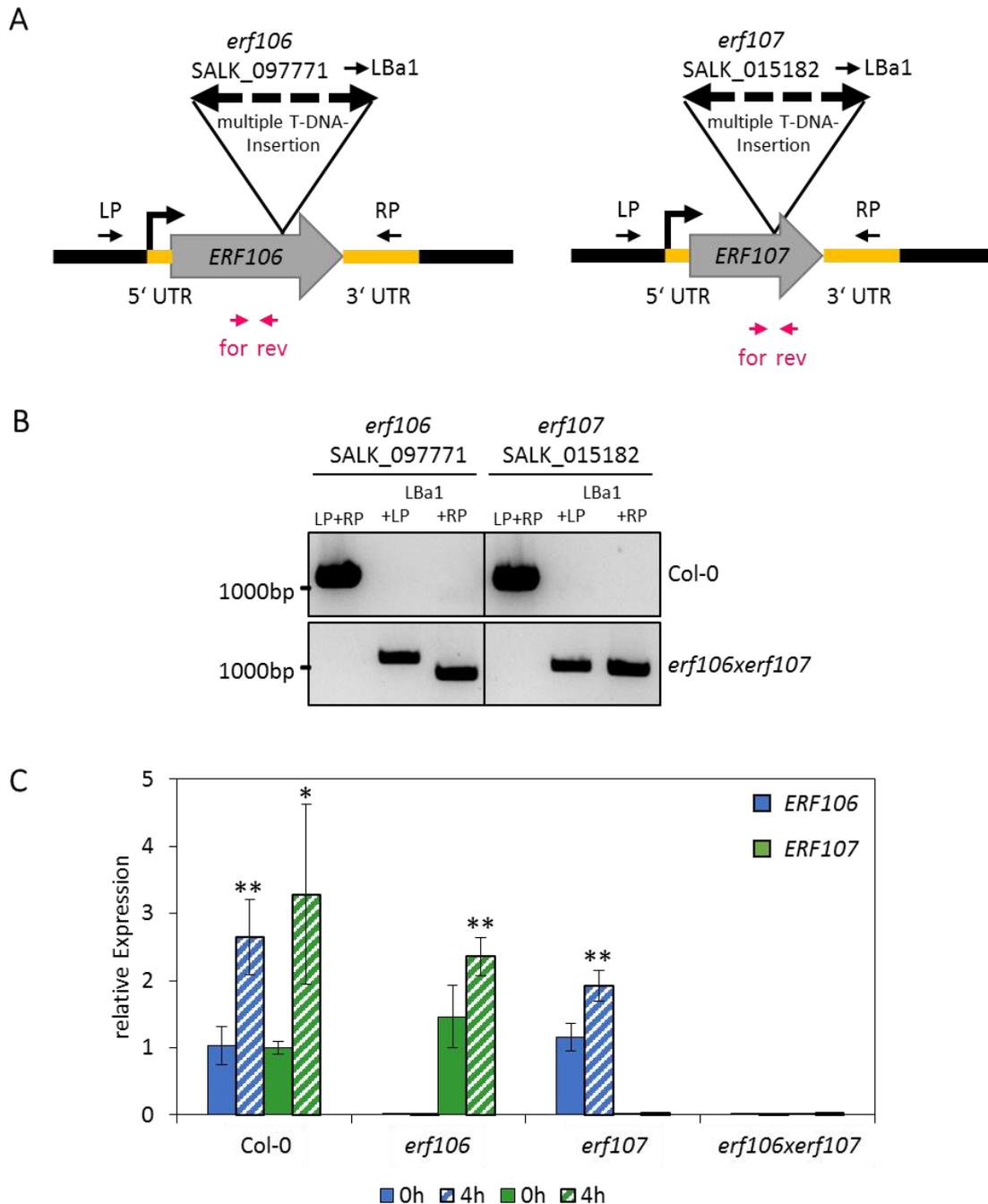


Abbildung 4.7 Charakterisierung der Funktionsverlust-Doppelmutante *erf106xerf107*. (A) Schematische Darstellung der genomischen Strukturen sowie der Lage der T-DNA-Insertionen in den Linien SALK_097771 (*erf106*) und SALK_015182 (*erf107*). Die untranslatierten Bereiche (UTR) sind gelb markiert, die großen grauen Pfeile stellen die Lage der Exons dar. Die kleinen schwarzen Pfeile geben die Lage der SALK-Primer LP und RP an, pinke Pfeile die Lage der für die qRT-PCR verwendeten Primer. Die großen schwarzen Pfeile zeigen die ungefähre Stelle der T-DNA-Insertion nach SIGnAL. (B) Test der Doppelmutante *erf106xerf107*, die durch Kreuzung der Linien SALK_097771 (*erf106*) und SALK_015182 (*erf107*) erhalten wurde, auf Homozygotie. Genomische DNA von Wildtyp Col-0 und *erf106xerf107* Pflanzen wurde durch PCR amplifiziert. Die Verwendung von LbA1 und RP oder LP Primern zeigt die Insertion der T-DNA, Amplifikation mit dem Primerpaar LP + RP zeigt die Abwesenheit der T-DNA. (C) Relative Transkript-Mengen von ERF106 (blau) und ERF107 (grün) nach 0h oder 4h (schraffiert) Hypoxia-Stress, detektiert durch qRT-PCR. Die statistische Analyse vergleicht die relative Genexpression der beiden Zeitpunkte 0h und 4h (MW +STABW, n≥3, *p≤0,05, **p≤0,01, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Die Analyse der Einzel-Mutanten *erf106* und *erf107* wie auch der Doppelmutante *erf106xerf107* zeigt wie bei Wildtyp Col-0 auf 9-HOT ein um etwa 50% verkürztes Wurzelwachstum (Abbildung 4.8). Eine Erhöhung der 9-HOT Konzentration (25 μM anstatt 20 μM) führt nur bei Col-0 zu einer weiteren Verkürzung der Wurzel auf 31% verglichen mit dem Wachstum auf 1xMS. Sowohl bei 20 μM als auch bei 25 μM 9-HOT sind die Unterschiede im Wurzelwachstum verglichen mit Col-0 auf der Kontrolle signifikant. Die Funktionsverlustmutanten verhalten sich auf 9-HOT wie der Wildtyp, bei allen Linien ist eine Reduktion des Wurzelwachstums zu beobachten. Der Verlust der TF ERF106 und ERF107 hat für die Pflanzen bei Oxylin-Stress keine Auswirkungen.

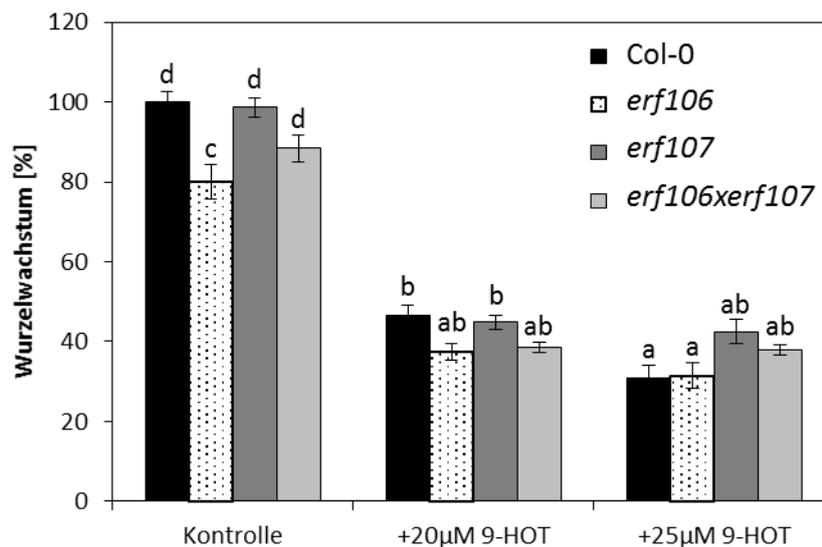


Abbildung 4.8 Die Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* wachsen auf 9-HOT vergleichbar mit dem Wildtyp Col-0. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf 1xMS-Kontrolle, 20 μM oder 25 μM 9-HOT analysiert. Das Wachstum von Col-0 auf Kontrollmedium wurde gleich 100% gesetzt, die Wurzellängen auf 9-HOT sowie der verschiedenen Linien in Relation zu Col-0 auf Kontrollmedium (MW+SE, n \geq 28, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Linien sind mit verschiedenen Buchstaben a, b, c, d markiert, one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni posthoc-Test, p \leq 0,05). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

4.2 Untersuchung der Funktion von ERF106 und ERF107 in *Arabidopsis thaliana*

4.2.1 Analyse des Wurzelwachstums von ERF106 bzw. ERF107 Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten auf verschiedenen Xenobiotika

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *ERF106* oder *ERF107* das Wurzelwachstum auf 9-HOT verbessert. Um herauszufinden, ob es sich dabei um einen 9-HOT-spezifischen Effekt handelt oder ob generell die Detoxifizierung induziert wird, wurde das Wurzelwachstum auch auf anderen Xenobiotika untersucht. Dabei wurden neben der Keto-Fettsäure 9-KOT und deren Ausgangsprodukt Linolensäure 18:3 auch TIBA (2, 3, 5-Trijodbenzoesäure) und NAA (1-Naphthalenessigsäure) untersucht. Von TIBA ist bekannt, dass es den Auxin-Transport hemmt und, ebenso wie NAA ein Pflanzenhormon aus der Auxin-Familie, ein kurzes Wurzelwachstum verursacht (Thimann, 1938; Weiste, 2011). Zudem induziert TIBA TGA-abhängige Detoxifizierungs-Gene wie *CYP81D11* (Fode *et al*, 2008; Köster *et al*, 2012). Als Vertreter aus der Gruppe der C₁₃-Oxylipine wurden auch OPDA und JA untersucht, die ebenfalls das Wurzelwachstum hemmen (Yamane *et al*, 1981; Staswick *et al*, 1992; Mueller *et al*, 2008). Zunächst wurden die Funktionsverlust-Mutanten auf den genannten Oxylipinen untersucht (Abbildung 8.2). Dabei zeigte sich auf Linolensäure mit 14% im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant kürzeres Wurzelwachstum bei der *erf106xerf107* Doppelmutante. Die Linie *erf106* wächst auf TIBA kürzer als die anderen getesteten Linien (2% im Vergleich zu 3% bei Col-0). Auf JA, OPDA und NAA sind bei allen untersuchten Linien keinerlei Unterschiede im Wurzelwachstum zu beobachten. Betrachtet man die induzierbaren Überexprimierer von *ERF106*, so zeigen beide unabhängigen XVE:ERF106 Linien sowohl auf 9-HOT als auch auf der Keto-Fettsäure 9-KOT ein signifikant verbessertes Wurzelwachstum auf 120% bzw. 140% verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 4.9). Die Hemmung des Wurzelwachstums durch 9-HOT wie auch durch 9-KOT ist mit etwa 80% im Vergleich zur Kontrolle recht stark. Linolensäure hat keinen solchen Effekt auf das Wurzelwachstum. TIBA hingegen führt zu einem nur noch 10%igen Wachstum der Wildtyp-Wurzeln. Nur die Linie XVE:ERF106-1A zeigt ein signifikant verbessertes Wurzelwachstum, jedoch auch nur auf eine Länge von 20% verglichen mit der Kontrolle. NAA reduziert das Wurzelwachstum bei Col-0 um etwa 50%, die Überexpression von ERF106 führt zu einem besseren Wachstum von etwa 81% bzw. 97%.

Der durch ERF106 angeschaltete Signalweg ist demnach nicht spezifisch für Oxylipine wie 9-HOT oder 9-KOT, sondern generell gegen Xenobiotika gerichtet. Zudem wurde das Wurzelwachstum von XVE:ERF106 auch auf JA und OPDA untersucht (Abbildung 8.3). Auf JA sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Col-0 zu beobachten.

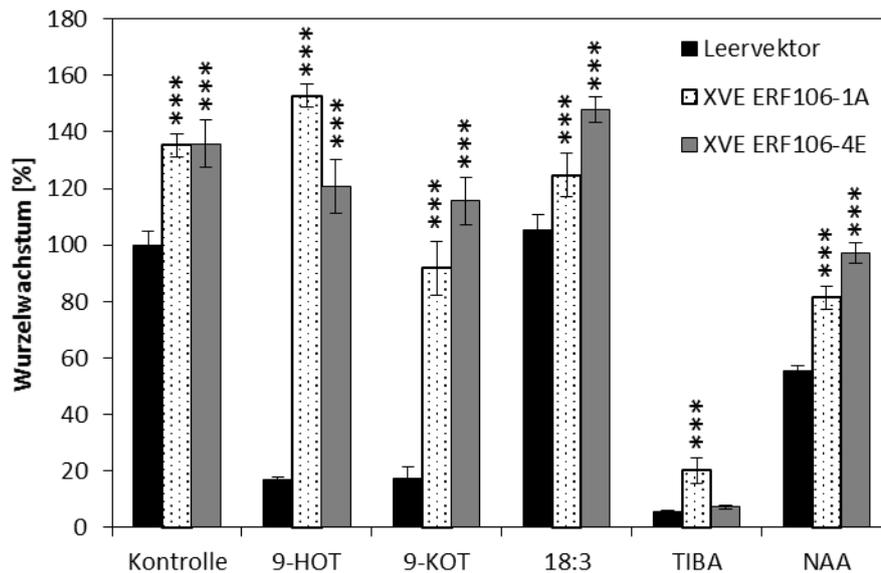


Abbildung 4.9 Überexpression von *ERF106* verbessert das Wurzelwachstum auf verschiedenen Xenobiotika. Die Wurzellänge von Leervektor, XVE:ERF106-1A und XVE-ERF106-4E wurde nach 5 Tagen Wachstum auf 1xMS-Kontrolle, 25µM 9-HOT, 25µM 9-KOT, 25µM 9-KOD, 25µM Linolensäure 18:3, 20µM TIBA oder 0,25µM NAA analysiert. Zusätzlich zu den Oxylipinen wurde 10µM β -Estradiol zugegeben. Das Wachstum von Leervektor-Kontrolle auf Kontrollmedium wurde gleich 100% gesetzt, die Wurzellängen auf 9-HOT sowie der verschiedenen Linien in Relation zu Col-0 auf Kontrollmedium. Die statistische Analyse vergleicht die Mutanten mit der Kontrolle Leervektor unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, $n \geq 18$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Das Wurzelwachstum auf OPDA dagegen ist durch die Überexpression von ERF106 auf 83% bzw. 82% (zum Vergleich Col-0: 68%) signifikant verbessert. Durch die Überexpression von ERF107 ergeben sich keine signifikanten Verbesserungen des Wurzelwachstums (Abbildung 8.3).

4.2.2 Analyse der differentiell exprimierten Gene in *erf106* und *erf107* Funktionsverlust-Mutanten

Die vermehrte Expression von *ERF106* oder *ERF107* hebt den Wurzelwachstums-hemmenden Effekt des Oxylipins 9-HOT auf. Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit der beiden TF eine Veränderung in der Signaltransduktion auslöst, wurden Transkriptom-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Gene ermittelt, die in den *loss-of-function*-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp differentiell exprimiert werden (differentiell exprimierte Gene, DEG). Tabelle 4.2 zeigt die Anzahl derjenigen DEG, deren Wert der Veränderung (\log_2 fold change, \log_2FC) bei mindestens $-1,5$ bzw. $1,5$ liegt. Die Tabellen mit diesen Daten aller untersuchten Mutanten sind im Anhang zu finden (Tabelle 8.2, 8.3, 8.4)). In den Einzelmutanten *erf106* und *erf107* sind 17 bzw. 12 Gene im Vergleich zu Col-0 aktiviert, und 2 bzw. 4 reprimiert. Betrachtet man dagegen die Linie *erf106xerf107*, in der beide TF ausgeschaltet sind, so

steigt die Zahl der signifikant aktivierten Gene auf 29 und die der reprimierten auf 83 deutlich an. Der Verlust beider TF führt demnach zu einer wesentlich größeren Veränderung als der Verlust eines der beiden TF, *ERF106* oder *ERF107*, was die Redundanz der beiden TF zeigt. Die Venn-Diagramme in Abbildung 4.10 zeigen die Überlappungen der einzelnen DEG-Listen. Bei den aktivierten Genen (Abbildung 4.10 (A)) zeigt sich lediglich eine Übereinstimmung von zwei Genen, die alle drei Mutanten gemeinsam haben: At3g29644, ein nicht beschriebenes Gen und At2g31730, ein bHLH-TF. Das Gen At1g21910 codiert für den ERF-TF DREB26 und wird in *erf106* und *erf107* verändert exprimiert. Betrachtet man die schwächer exprimierten Gene (Abbildung 4.10 (B)) so gibt es keine Übereinstimmungen zwischen den Einzel-Mutanten. In *erf106* und *erf106xerf107* werden zwei übereinstimmende Gene reprimiert, eines davon ist *ERF106* (At5g07580), bei dem anderen handelt es sich um das Membranprotein TSPO (At2g47770), das eine Rolle in der Antwort auf Salz-Stress spielt (Balsemão-Pires *et al*, 2011). Beim Vergleich von *erf107* mit *erf106xerf107* findet sich zum einen *ERF107* (At5g61590), zum anderen At2g42220, einem *Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily* Protein, das noch nicht näher erforscht ist.

Tabelle 4.2 Anzahl der im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,5$ differentiell exprimierten Gene in den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* ($p \leq 0,01$).

Mutante	Anzahl aktivierte Gene	Anzahl reprimierte Gene	Anzahl aller DEG
<i>erf106</i>	17	2	19
<i>erf107</i>	12	4	16
<i>erf106xerf107</i>	29	83	112

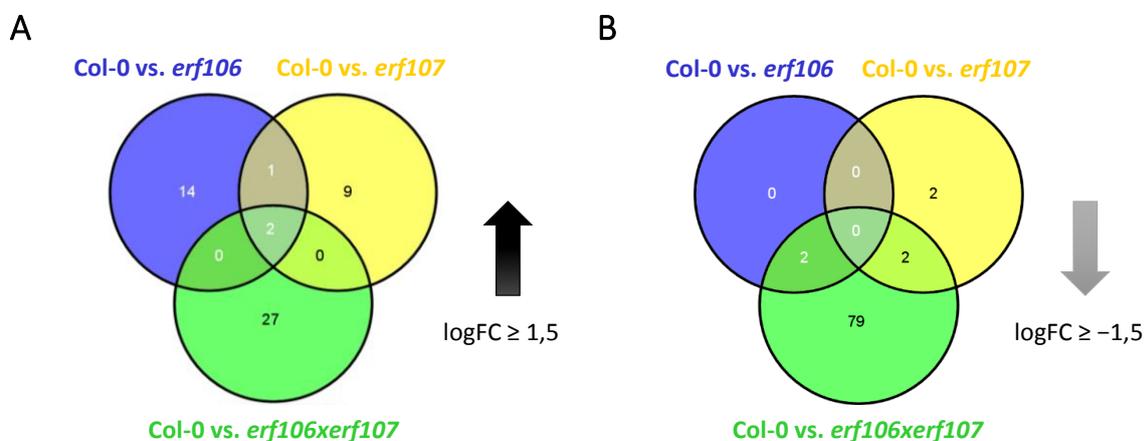


Abbildung 4.10 Venn-Diagramm der im Vergleich zu Wildtyp Col-0 differentiell exprimierten Gene in den Funktionsverlust-Mutanten. (A) Die Anzahl der aktivierten Gene mit $\log_2FC \geq 1,5$ (B) Die Anzahl der inhierten Gene mit $\log_2FC \leq -1,5$ ($p \leq 0,01$). Blau vergleicht Col-0 mit *erf106*, gelb Col-0 mit *erf107* und grün Col-0 mit *erf106xerf107*.

Um die biologische Relevanz der verändert exprimierten Gene zu analysieren, wurden diese in Genfamilien sortiert, wie in Tabelle 4.3 für die aktivierten und in Tabelle 4.4 für die inhibierten Gene zu sehen. Unter den aktivierten Genen befinden sich viele TF, insbesondere in der Doppelmutante *erf106xerf107*. Bei den inhibierten Genen gehören 6 von 83 DEG in *erf106xerf107* zur TF-Familie, jeweils weitere 6 Gene sind Cytochrom P450 Monooxygenasen oder spielen eine Rolle im Zuckertransport oder im Zuckermetabolismus, weitere 5 der DEG sind Kinasen.

Tabelle 4.3 Einordnung in Genfamilien der im Vergleich zu Col-0 mit einem Induktionswert $\geq 1,5$ differentiell exprimierten Gene in den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* ($p \leq 0,01$).

Aktivierete Gene	<i>erf106</i>	<i>erf107</i>	<i>erf106xerf107</i>
Gesamtanzahl DEG ($\log_2FC \geq 1,5$)	17	12	29
Zuordnung zu Genfamilie:			
Transkriptionsfaktor	2	4	7

Tabelle 4.4 Einordnung in Genfamilien der im Vergleich zu Col-0 mit einem Induktionswert $\geq -1,5$ differentiell exprimierten Gene in den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* ($p \leq 0,01$).

Reprimierte Gene	<i>erf106</i>	<i>erf107</i>	<i>erf106xerf107</i>
Gesamtanzahl DEG ($\log_2FC \geq -1,5$)	2	4	83
Zuordnung zu Genfamilie:			
Transkriptionsfaktor	1	1	6
Cytochrom P450 (CYP)	–	–	6
Zuckertransport oder -metabolismus	–	–	6
Kinasen	–	–	5

Werden die beiden TF ERF106 bzw. ERF107 einzeln in *Arabidopsis thaliana* ausgeschaltet, so treten nur sehr geringe Veränderungen im Transkriptom der Pflanzen auf. Beim Ausschalten beider TF kommt es aufgrund von Redundanz zu drastischeren Veränderungen in der Pflanze, insbesondere in Signaltransduktionskomponenten (TF, Kinasen), aber auch im Zuckertransport bzw. –metabolismus und bei der Detoxifizierung (Cytochrom P450 Monooxygenasen). Auffallend ist auch die Aktivierung von *bhlh038*, *bHLH039*, *bHLH100* sowie *bHLH101* in der Doppelmutante. Diese TF sind wichtig für die Regulation der Eisen-Aufnahme (Sivitz *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013). Um die Funktionen von ERF106 und ERF107 genauer zu erforschen, ist es weiterhin wichtig, auch die Signalwege nach vermehrter Expression zu analysieren.

4.2.3 Analyse der differentiell exprimierten Gene in ERF106 und ERF107

Funktionsgewinn-Mutanten

Bei der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion wurden die Überexpressions-Linien von ERF106 und ERF107 mit verbessertem Wurzelwachstum auf 9-HOT ermittelt. Was genau in Pflanzen mit erhöhten ERF106- und ERF107-Spiegeln verändert sind, ist bislang nicht bekannt. Um herauszufinden, für welche pflanzlichen Funktionen die beiden TF wichtig sind, sollte auch erforscht werden, welchen Einfluss die vermehrte Anwesenheit von ERF106 und ERF107 auf die Genexpression hat. Dazu wurden die XVE:ERF106 und XVE:ERF107 Pflanzen verwendet, bei denen durch Gabe von β -Estradiol die Überexpression der TF gezielt angeschaltet wurde. Als Kontrolle dienten die unbehandelten Pflanzen. Um herauszufinden, wie sich die Genexpression in solchen Pflanzen ändert, wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt. Abbildung 8.4 im Anhang zeigt als Kontrolle die Expression von *ERF106* bzw. *ERF107*, ermittelt per qRT-PCR. Abbildung 4.11 zeigt die Transkriptom-Daten nach einer Clusteranalyse. Alle Replikate der Proben XVE:ERF106 (blau) und XVE:ERF107 (grün), jeweils Kontrolle und nach β -Estradiol-Behandlung, sind aufgrund der Ähnlichkeit der Datensätze im Diagramm angeordnet. Die unbehandelten Proben sowohl von XVE:ERF106 als auch von XVE:ERF107 liegen auf der rechten Seite des Diagramms. Nach Zugabe von β -Estradiol und dadurch induzierter Überexpression von *ERF106* respektive *ERF107* entfernen sich die Replikate aufgrund der Veränderungen von den unbehandelten Proben. Die Nähe der Wiederholungen einer Probe zueinander zeigt die gute Reproduzierbarkeit. Einzig bei der Kontrolle zu XVE:ERF106 liegt ein Replikat etwas entfernt von den beiden anderen. Erwartungsgemäß sind die größten Unterschiede nach Aktivierung der Überexpression zu beobachten.

Durch Überexpression von *ERF106* werden 317 Gene mehr als 1,5fach ($\log_2FC \geq 1,5$) exprimiert, bei *ERF107* sind es 198 Gene (Abbildung 4.12 (A)). Die vollständigen Datensätze der DEG mit Induktionswerten $\geq \pm 1,5$ sind in den Tabellen 8.5 und 8.6, die Übereinstimmungen der Gene in den Tabellen 8.7 und 8.8 im Anhang zu finden. Davon sind 40 Gene sowohl durch *ERF106* als auch durch *ERF107* aktiviert. Die Zahlen für die reprimierten Gene sind für beide TF deutlich geringer (Abbildung 4.12 (B)). Mit $\log_2FC \geq -1,5$ als Grenzwert sind bei XVE:ERF106 88 Gene und bei XVE:ERF107 nur 20 Gene differentiell exprimiert. Davon werden sieben Gene von beiden TF reguliert. Es werden wesentlich mehr Gene aktiviert (317 bzw. 198) als reprimiert (88 bzw. 20). In diesem Fall ist die Redundanz von ERF106 und ERF107 geringer.

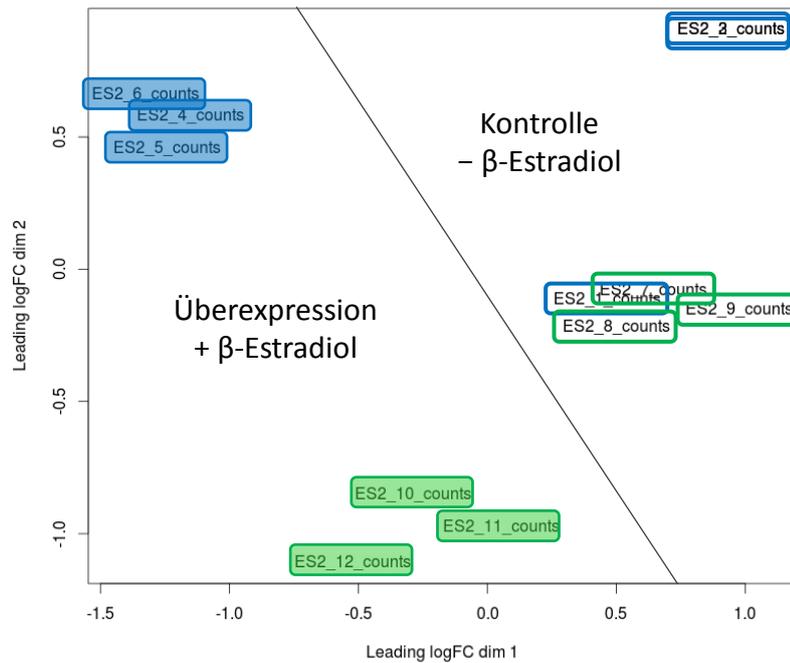


Abbildung 4.11 Hauptkomponentenanalyse (PCA) von XVE:ERF106 (blau) und XVE:ERF107 (grün) (Kontrolle und nach β -Estradiol-Behandlung) nach Transkriptom-Analyse mittels RNAseq. Die zusammengehörenden Replikate sind farblich markiert. XVE:ERF106 Kontrolle: blau umrandet, XVE:ERF106 + β -Estradiol: blau, XVE:ERF107 Kontrolle: grün umrandet und XVE:ERF107 + β -Estradiol: grün.

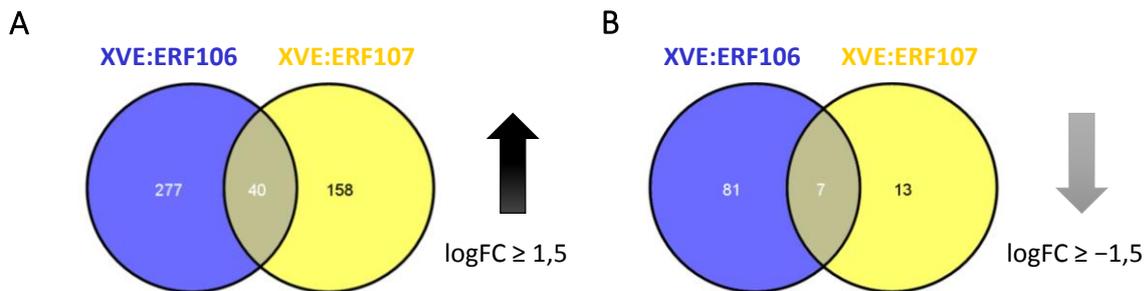


Abbildung 4.12 Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene in den Funktionsgewinn-Mutanten XVE:ERF106 und XVE:ERF107. Gezeigt sind (A) die Zahlen der aktivierten Gene mit $\log_2FC \geq 1,5$ und (B) die der inhibierten Gene mit $\log_2FC \leq -1,5$ ($p \leq 0,01$). Blau vergleicht XVE:ERF106 ohne und mit β -Estradiol-Behandlung, gelb XVE:ERF107 ohne und mit β -Estradiol-Behandlung.

Um die große Anzahl an DEG besser untersuchen zu können, wurden die Gene gemäß ihrer (putativen) Funktionen und bekannten Daten in verschiedene Kategorien eingeteilt. Diese Zuordnung erfolgte manuell. Tabelle 4.5 zeigt das Ergebnis. Sowohl bei *ERF106* als auch bei *ERF107* ist etwa die Hälfte der aktivierten und reprimierten Gene unbekannt. Von den bekannten Genen werden durch Überexpression der TF im Bereich der Signaltransduktion viele Gene aktiviert. Auch für Metabolismus

und Stressabwehr bekannte Gene werden von ERF106 und ERF107 aktiviert. Beide TF aktivieren viele Detoxifizierungs-Gene, wie Cytochrom P450 Monooxygenasen und Glutathion-S-Transferasen (Marrs, 1996; Loeffler *et al*, 2005; Fode *et al*, 2008; Mueller *et al*, 2008; Denison & Whitlock, 1995; Guengerich, 1991). Bei genauerer Analyse der Gene aus dem Bereich Metabolismus fällt auf, dass mit dem Grenzwert von mindestens 1,5facher Induktion nur *ERF106* die Gene aus der Tryptophan-Biosynthese bzw. aus dem Indol-Glukosinolat-Weg aktiviert. *ERF107* dagegen aktiviert vermehrt Oxidoreduktasen. Auch bei den an der Signaltransduktion beteiligten Genen gibt es Unterschiede zwischen den beiden TF. Durch *ERF106* werden 24 andere TF aktiviert, *ERF107* dagegen aktiviert 14 Hitzeschock-Proteine. Die von *ERF106* oder *ERF107* reprimierten Gene sind in der Anzahl deutlich geringer. *ERF106* inhibiert 4 Lipid-Transfer-Proteine und 6 Proteine der *late embryogenesis abundant* (LEA)-Familie. Die genauen Funktionen dieser Gene sind noch nicht erforscht. *ERF107* hemmt 4 TF und 6 Gene, die für die Stressabwehr wichtig sind.

Tabelle 4.5 Einteilung der in der Transkriptom-Analyse DEG (aktiviert und inhibiert mit $\log_2FC \geq 1,5$ bzw. $\log_2FC \geq -1,5$, ($p \leq 0,01$)) in XVE:ERF106 und XVE:ERF107 nach Funktion. Die fett gedruckten Zahlen geben die Anzahl der DEG in den Hauptkategorien an, die Summe ergibt die Gesamtzahl. Die Einteilung zu den Unterkategorien in den verschiedenen Klassen ist kursiv dargestellt.

Klassifizierung der DEG	XVE:ERF106 aktiviert	XVE:ERF106 inhibiert	XVE:ERF107 aktiviert	XVE:ERF107 inhibiert
Detoxifizierung	25	6	22	1
<i>Cytochrom P450</i>	6	2	7	0
<i>Glykosyltransferase</i>	7	2	2	0
<i>Glutathion-S-Transferase</i>	7	0	7	0
<i>Peroxidase</i>	3	2	2	0
Metabolismus	39	7	15	2
<i>Trp-Indol-Camalexin-Biosynthese</i>	11	0	0	0
<i>Oxidoreduktase</i>	5	3	10	0
Signaltransduktion	54	12	44	4
<i>TF</i>	24	5	7	4
<i>Rezeptor</i>	0	0	4	0
<i>Hitzeschock</i>	3	1	14	0
<i>Kinase</i>	27	6	19	0
Stressabwehr	13	6	18	6
<i>LEA Proteinfamilie</i>	1	6	0	0
<i>Defensine</i>	4	0	1	1
Transporter / Membran	22	10	13	1
Zellwand	0	2	0	0
Unbekannt	162	45	72	5
Gesamtzahl DEG	317	88	196	20

Da durch *ERF106* auffallend viele Gene aktiviert werden, die am Tryptophan-Biosyntheseweg oder der Synthese von Tryptophan-verwandten Sekundärmetaboliten beteiligt sind, erfolgte eine genauere Analyse dieses Stoffwechselwegs. Abbildung 4.13 zeigt das Flussdiagramm der Tryptophan-

Biosynthese sowie der Indol-Glukosinolate und Camalexin. Der Grenzwert der Induktion wurde hier auf $\log_2FC \geq 1,0$ gesetzt, um auch die durch *ERF107* aktivierten Gene verfolgen zu können. Die Induktionswerte nach *ERF106*-Überexpression (blau dargestellt) zeigen, dass sehr viele Gene aus dem gesamten Stoffwechselweg in Anwesenheit von *ERF106* stärker exprimiert werden.

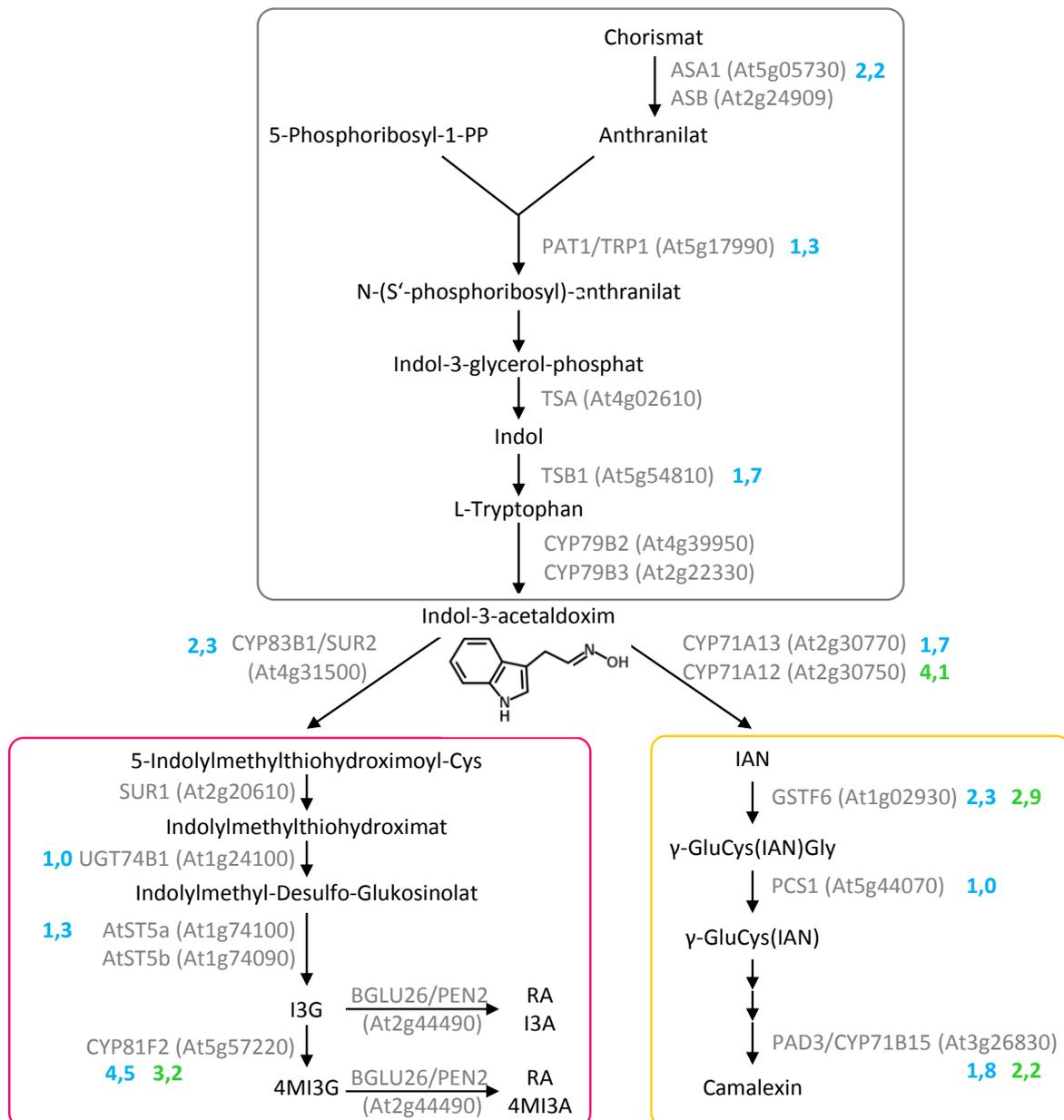


Abbildung 4.13 Überexpression von *ERF106* bzw. *ERF107* aktiviert die Expression der Biosynthese-Gene von Tryptophan-verwandten Sekundärmetaboliten. Das Flussdiagramm zeigt den Ablauf der Biosynthese von Tryptophan (grau markiert) sowie den Tryptophan-verwandten Sekundärmetaboliten Indol-Glukosinolate (linker Zweig, pink markiert) und Camalexin (rechter Zweig, gelb markiert). Dargestellt sind die wichtigsten Zwischenprodukte (schwarz) und die beteiligten Enzyme (grau), sowie die signifikanten Induktionswerte ($\log_2FC \geq 1,0$) nach Überexpression von *ERF106* (blau) oder *ERF107* (grün). Abkürzungen: I3G: Indol-3-ylmethylglukosinolat, 4MI3G: 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat, RA: *Raphanusamic Acid*, I3A: Indol-3-ylmethylamin, 4MI3A: 4-Methoxyindol-3-ylmethylamin, IAN: Indol-3-Acetonitril. Modifizierte Abbildung nach Iven et al.

ERF107 hingegen aktiviert hauptsächlich den Camalexin-Syntheseweg. Interessanterweise werden von beiden TF die Enzyme an den Abzweigungen zum Indol-Glukosinolat-Zweig oder Camalexin-Zweig deutlich aktiviert. Durch *ERF106* wird *CYP83B1* 2,3fach induziert. Auch die Cytochrom P450 Monoxygenase *CYP81F2*, entscheidend für den letzten Schritt der Indol-Glukosinolat-Synthese, die Umwandlung von Indol-3-ylmethylglukosinolat zu 4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat (Bednarek *et al*, 2009; Iven *et al*, 2012) wird 4,5fach von *ERF106* aktiviert, von *ERF107* 3,2fach. Die entscheidenden Schritte in der Camalexin-Biosynthese werden dagegen hauptsächlich durch *ERF107* aktiviert. *CYP71A12* wird 4,1fach, *GSTF6* 2,9fach und *PAD3* 2,2fach angeschaltet.

Zur Validierung wurde die relative Expression dieser Gene zusätzlich mit quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Von den Genen, die in der Tryptophan-Biosynthese eine Rolle spielen, werden nur *ASA1* und *CYP79B2* 4,7fach bzw. 2,8fach durch *ERF106* angeschaltet.

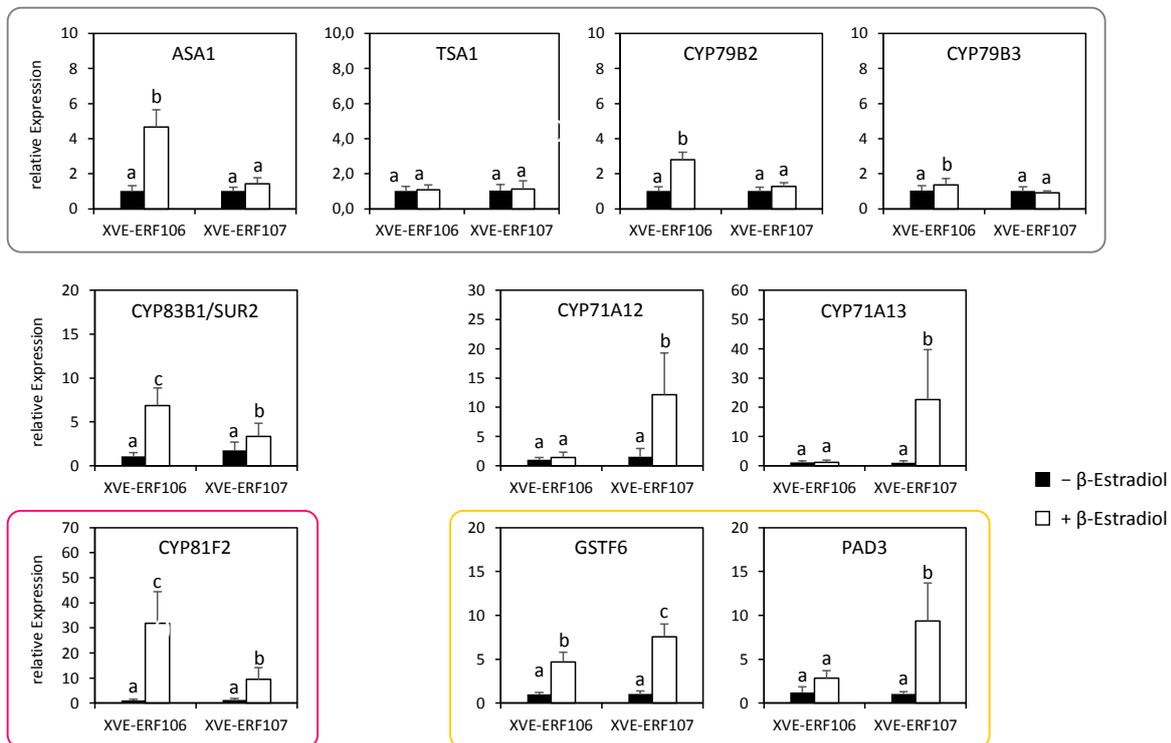


Abbildung 4.14 ERF106 aktiviert die Biosynthese-Gene der Indol-Glukosinolate, ERF107 die der Camalexine. Gezeigt ist die relative Expression wichtiger Gene aus dem Tryptophan-Biosyntheseweg bzw. des Trp-abhängigen Sekundärstoffwechsels in den induzierbaren Überexpressions-Linien XVE:ERF106 und XVE:ERF107. Schwarze Balken zeigen die Induktionswerte der Kontrolle, weiße Balken die Werte nach β-Estradiol-Behandlung und so induzierter Überexpression von ERF106 bzw. ERF107. Die graue Umrahmung zeigt die Zugehörigkeit zum Tryptophan-Biosyntheseweg, pink markiert den Indol-Glukosinolat-Zweig und gelb die Camalexin-Biosynthese. Die relative Genexpression wurde mittels qRT-PCR analysiert (MW +STABW, n=6, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Linien sind mit verschiedenen Buchstaben a, b, c markiert, one-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni post-hoc Test, p≤0,05).

Die Überexpression von ERF107 verändert die Expression dieser Gene nicht. *TSA1* und *CYP79B3* werden weder durch ERF106 noch durch ERF107 signifikant aktiviert. Auf der Seite des Indol-Glukosinolat-Zweigs wurden die Schlüssel-Gene *CYP83B1* und *CYP81F2* untersucht. Beide werden durch ERF106 deutlich stärker aktiviert als durch ERF107. Im Camalexin-Biosynthese-Zweig wurden vier Gene untersucht. *CYP71A12* und *CYP71A13*, die am Flaschenhals der Camalexin-Biosynthese entscheidend sind, werden ausschließlich durch ERF107 aktiviert. *GSTF6* wird sowohl von ERF106 als auch von ERF107 angeschaltet, während die Expression von *PAD3* in Anwesenheit von ERF107 wieder deutlich verstärkt ist und durch ERF106 wesentlich schwächer aktiviert wird. Es konnte also bestätigt werden, dass bedeutende Gene des Indol-Glukosinolat-Biosynthesewegs durch *ERF106* aktiviert werden, während *ERF107* auf der anderen Seite die Gene aus dem Camalexin-Biosyntheseweg aktiviert. Camalexin wird in *Arabidopsis* bei biotischem Stress gebildet (zur Übersicht siehe Glawischnig, 2007).

Die Aktivierung von Cytochrom P450 Monooxygenasen, Glutathion-S-Transferasen, Glykosyltransferasen und Peroxidasen zeigt zudem, dass durch Überexpression von ERF106 und ERF107 die Detoxifizierung deutlich aktiviert wird. Weiterhin sind unter den am stärksten durch ERF106 aktivierten Genen auffallend viele Defensine zu finden (siehe Tabelle 4.5 und Tabelle 8.3). Diese sind wichtig für die Pathogenabwehr (Thomma *et al*, 2002; Stotz *et al*, 2009; Po-Wen *et al*, 2013; Castro & Fontes, 2005; Terras *et al*, 1995). Ebenfalls stark induziert ist *MYB63*, von dem bekannt ist, dass er die Lignin-Biosynthese transkriptionell aktiviert (Zhou *et al*, 2009). *MYB15*, der nach *Verticillium longisporum*-Infektion exprimiert wird (Iven, 2009), wird genauso durch ERF106 induziert. OPDA und Verwundung schalten die Expression von *MYB15* an (Taki *et al*, 2005). *MYB15* agiert als Repressor und reguliert so die Kälte-induzierten CBF TF (Agarwal *et al*, 2006). Diese werden durch ERF106 oder ERF107 jedoch nicht reguliert. Auch durch ERF107 werden für die Immunantwort wichtige Gene angeschaltet, darunter ebenfalls *MYB15*, aber auch *FRK1* (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1*) (Asai *et al*, 2002), *WRKY30* (Scarpeci *et al*, 2013) und verschiedene Cytochrom P450-Gene. ERF106 und ERF107 zeigen auch hier die Aktivierung derselben Antworten, zum Teil jedoch über unterschiedliche Wege. Durch ERF107 werden mehrere bHLH-TF gehemmt (*bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100* und *bHLH101*), die in der Antwort auf Eisen-Mangel eine Rolle spielen (Sivitz *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013), sowie *IRT1* (*IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*), ein Eisen-Transporter (Eide *et al*, 1996), und *FRO2* (*FERRIC REDUCTION OXIDASE 2*), eine Eisen-Reduktase (Robinson *et al*, 1999). ERF106 hemmt diese Gene ebenfalls, verglichen mit ERF107 liegt hier der Fokus auf *IRT1* und *FRO2* und weniger auf den bHLH TF (Abbildung 4.15).

		XVE:ERF106	XVE:ERF107
bHLH038	At3g56970		-2,5
bHLH039	At3g56980	-1,6	-2,0
bHLH100	At2g41240	-2,3	-2,4
bHLH101	At5g04150		-1,7
IRT1	At4g19690	-3,3	-1,5
FRO2	At1g01580	-2,0	-1,5

Abbildung 4.15 Überexpression von *ERF106* bzw. *ERF107* führt zur Hemmung verschiedener Gene der Eisen-Aufnahme-Regulation. Beschrieben sind die TF bHLH038, bHLH039, bHLH100, bHLH101, sowie der Eisentransporter IRT1 und die Eisen-Reduktase FRO2. Gezeigt sind nur die Werte (\log_2FC) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ aus der Transkriptom-Analyse nach vermehrter Expression von *ERF106* bzw. *ERF107*. Die Farbintensität zeigt die Stärke der Hemmung an, von weiß (wenig gehemmt) bis rot (stark gehemmt).

Zusammenfassend fällt auf, dass die beiden TF ERF106 und ERF107 mehr Gene aktivieren als hemmen. Der Fokus bei den aktivierten Genen liegt neben der Signaltransduktion bei der Detoxifizierung und dem Stressabwehr bzw. dem Metabolismus von Abwehrstoffen wie Camalexin und Indol-Glukosinolaten. Dieses Ergebnis bestätigt die Ausgangs-Hypothese und zeigt die Plausibilität der Durchmusterung der *AtTORF-Ex*-Kollektion auf 9-HOT.

4.3 Untersuchung weiterer Funktionen von ERF106 und ERF107 unter natürlichen Bedingungen

Die vorangegangenen Analysen der Funktionsverlust-Mutanten von *ERF106* und *ERF107* zeigen, dass der Verlust der beiden Gene für die Pflanze bei Überflutung kaum Folgen hat. Die Funktionsgewinnmutanten dagegen zeigen auf transkriptioneller Ebene vor allem Aktivierung der Stressabwehr, vor allem Gene für die Detoxifizierung und Pathogenantwort werden vermehrt exprimiert. Um herauszufinden, für welche pflanzlichen Funktionen die beiden TF wichtig sind, wurden natürliche Bedingungen gesucht, unter denen die Genexpression von *ERF106* und *ERF107* induziert wird.

4.3.1 Analyse der Genexpression von ERF106 bzw. ERF107 abhängig von Stressbedingungen

Das Wurzelwachstum von 35S:ERF106 und 35S:ERF107 auf dem Oxylin 9-HOT ist verglichen mit anderen 35S:TF Pflanzen und dem Wildtyp Col-0 deutlich verbessert. Ob es eine Art Rückkopplung gibt und 9-HOT auch die Genexpression von *ERF106* und *ERF107* beeinflusst, war bislang nicht bekannt.

Um das zu überprüfen, wurden 2 Wochen alte Wildtyp-Pflanzen an vier verschiedenen Zeitpunkten auf 1xMS-Platten mit 25µM 9-HOT transferiert und zu einem gemeinsamen Zeitpunkt geerntet, um Schwankungen durch circadiane Veränderungen auszuschließen. Abbildung 4.16 zeigt, dass 9-HOT die Expression von *ERF106* und *ERF107* weder im Blatt (A) noch in der Wurzel (B) aktiviert.

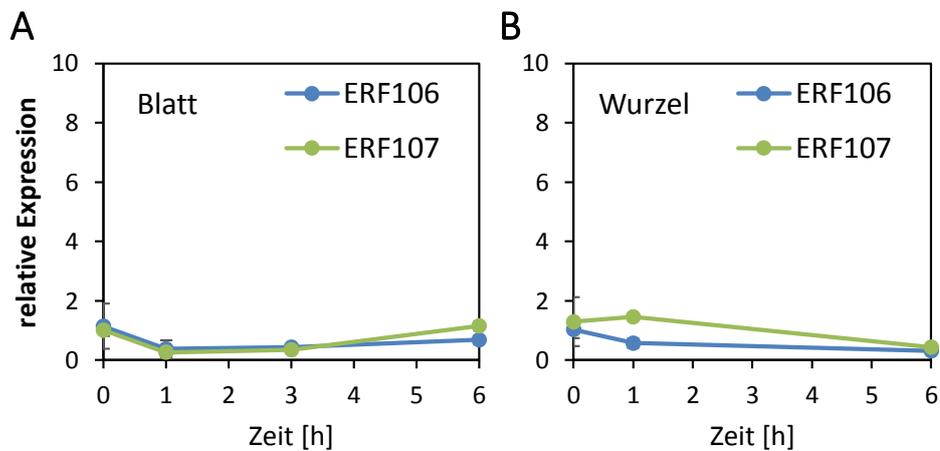


Abbildung 4.16 9-HOT-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Genexpression von *ERF106* und *ERF107*. Nach verschiedenen Zeiten (0 h, 1 h, 3 h oder 6 h) auf 1xMS-Platten mit 25µM 9-HOT wurde die relative Expression mittels qRT-PCR in Blatt (A) oder Wurzel (B) von 2 Wochen alten Col-0 Pflanzen analysiert (MW +STABW, n≥3). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Durch Überexpression von *ERF106* werden Gene für die Pathogenabwehr sehr stark aktiviert, darunter viele Defensine (PDF1.3, PDF1.2, PDF1.2b und PDF1.2c) (siehe Tabelle 8.5). Nach vermehrter Expression von *ERF107* ist in dieser Hinsicht keine Veränderung erkennbar. Dies führt zu der Annahme, dass die Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Pathogenen zeigen. Um diese These zu überprüfen, wurde zunächst eine Infektion mit *Pseudomonas* durchgeführt. Wie in Abbildung 4.17 (A) zu sehen, wird die Expression von *ERF106* und *ERF107* nach *Pst*-Infektion nicht aktiviert. Da keine homozygoten konstitutiven Überexpressionslinien von den beiden TF zur Verfügung standen wurde in diesem Zusammenhang das Wachstum der Bakterien nach Infektion in Col-0 und den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* untersucht. Es zeigt sich dabei kein Unterschied im Wachstum von *Pseudomonas* in den Mutanten verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 4.17 (B)).

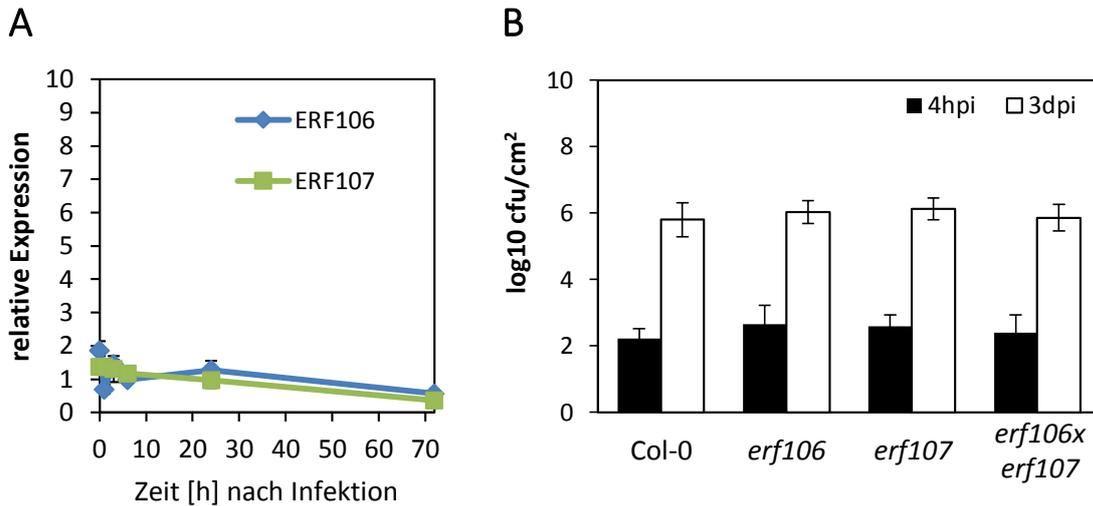


Abbildung 4.17 Infektion mit *Pseudomonas* hat keinen Einfluss auf die Genexpression von *ERF106* und *ERF107* und durch Mutation zeigt sich kein Unterschied in der Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas*. (A) Relative Expression von *ERF106* und *ERF107* in mit *Pseudomonas syringae* PstDC3000 infizierten Blättern 1 h, 3 h, 6 h, 24 h und 72 h nach Infektion. Die Analyse erfolgte mittels qRT-PCR (MW +STABW, n=4). (B) Wachstum von *Pseudomonas syringae* PstDC3000 nach Infektion in Col-0 oder in die Mutanten erf106, erf107 und erf106xerf107, angegeben in koloniebildenden Einheiten pro cm² (colony forming units, cfu/cm²), 4 Stunden oder 3 Tage nach Infektion (hpi/dpi). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

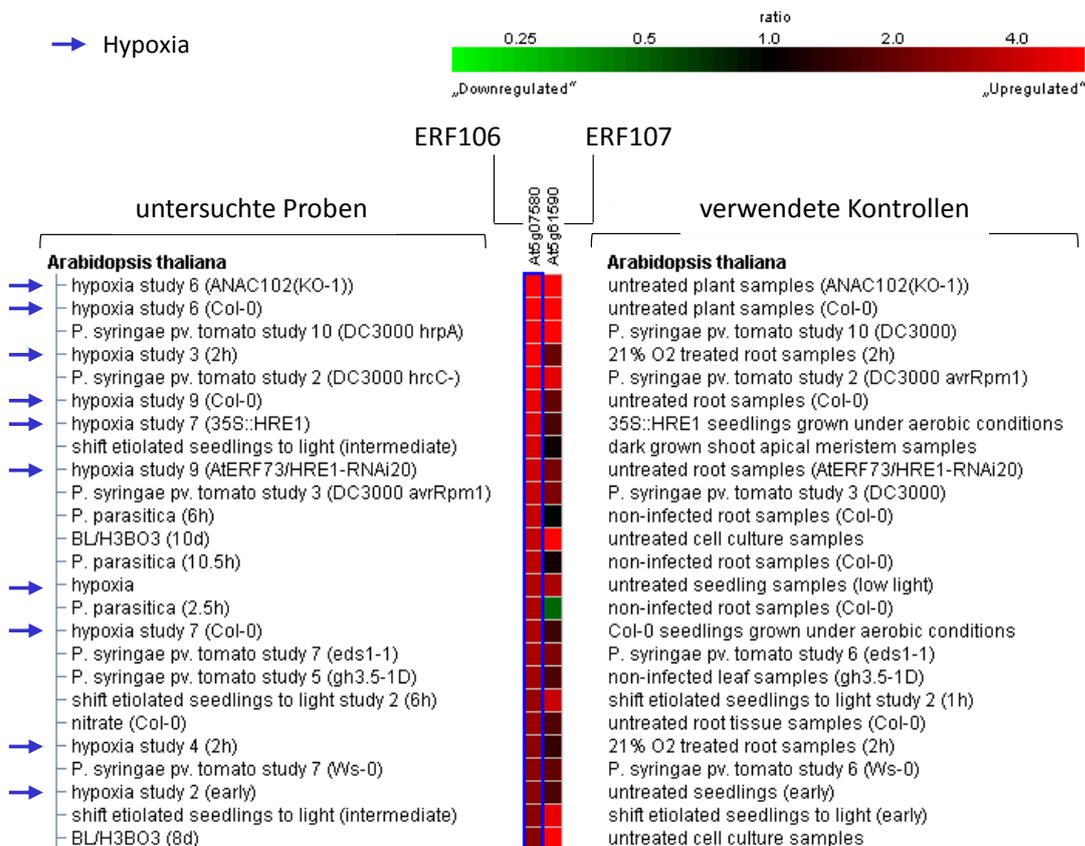


Abbildung 4.18 Die Genevestigator-Analyse zeigt Hypoxia als aktivierenden Stimulus für die Expression von *ERF106* und *ERF107*. Dargestellt sind die 25 Studien mit den stärksten Induktionswerten, geordnet nach At5g07580 (*ERF106*). Hypoxia-Studien sind mit einem blauen Pfeil markiert. Modifizierte Grafik aus Genevestigator.

Zur Identifikation möglicher Stimuli von *ERF106* und *ERF107* wurde weiterhin die Genexpressions-Datenbank Genevestigator durchsucht (Hruz *et al*, 2008). Dort waren unter den 25 am stärksten aktivierenden Stimuli für beide TF hauptsächlich Hypoxia-Studien (10 von 25) (Abbildung 4.18). Hypoxia bedeutet Sauerstoffmangel, der natürlicherweise durch Überflutung, experimentell auch durch Stickstoff-Zufuhr ausgelöst werden kann. Für diese Arbeit wurde Überflutung mit Wasser als natürlichere Variante der Hypoxia gewählt. Abbildung 4.19 zeigt, dass im Wildtyp Col-0 sowohl *ERF106* als auch *ERF107* nach 3 Stunden mit Werten im Blatt (Abbildung 4.19 (A)) von 17- bzw. 14-fach und in der Wurzel (Abbildung 4.19 (B)) von 15- bzw. 12-fach deutlich aktiviert werden. Die Hypoxia-Marker-Gene *PYRUVAT DECARBOXYLASE PDC2* und *PDC3* werden nach drei Stunden etwa 45fach induziert (Abbildung 8.5).

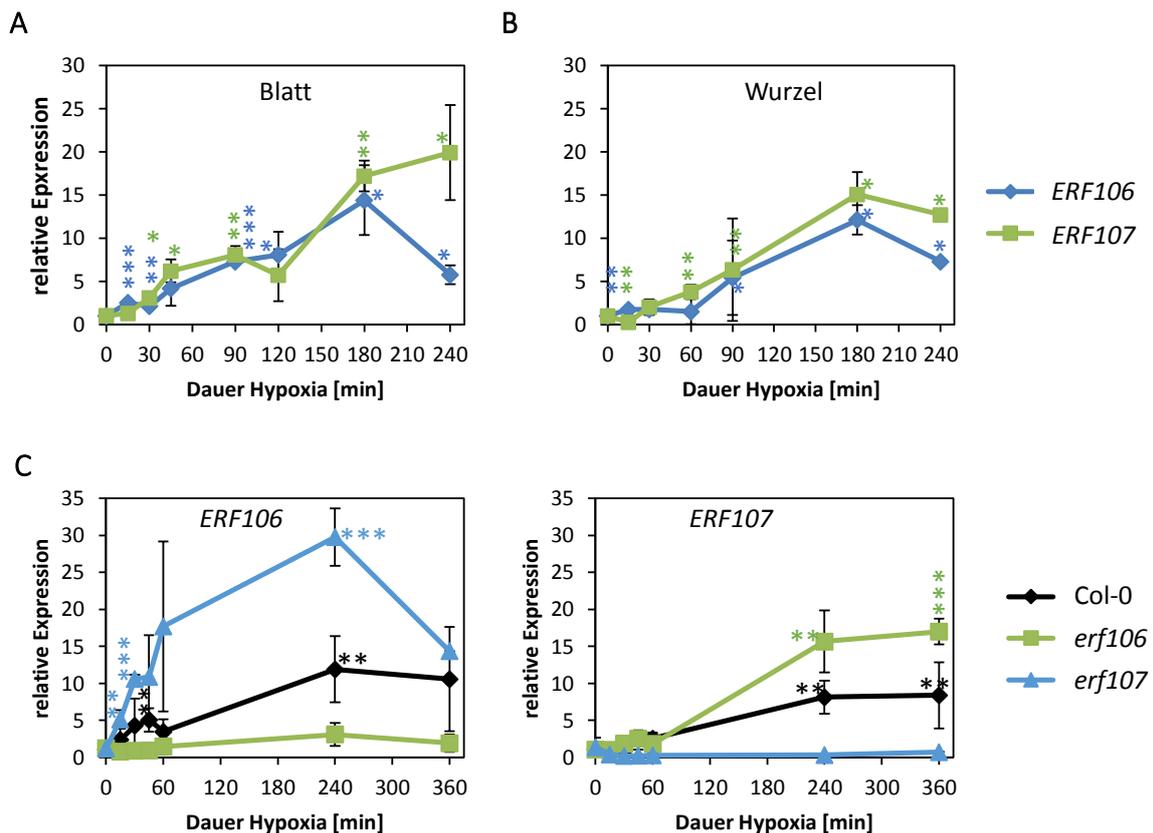


Abbildung 4.19 Überflutung aktiviert die Genexpression von *ERF106* und *ERF107*. Zu verschiedenen Zeitpunkten (15 – 240 min) nach Überflutung wurde die relative Genexpression mittels qRT-PCR in Wurzeln von zwei Wochen alten Keimlingen analysiert. (A) Untersucht wurde die Expression von *ERF106* (blau) und *ERF107* (grün) in Blatt (A) und Wurzel (B) von Col-0 Keimlingen, bzw. die Expression in ganzen Keimlingen (C) der Linien Wildtyp Col-0 (schwarz), *erf106* (grün) und *erf107* (blau). Die statistische Analyse vergleicht die Genexpression des Zeitverlaufs mit dem Startzeitpunkt 0min (MW +STABW, n=8 (A und B), n=3 (C), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: einseitig, homoskedatisch). Der Versuch wurde mehrmals mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

Um herauszufinden, ob die Genexpression von *ERF106* und *ERF107* durch die Funktionsverlustmutationen beeinflusst wird, wurden neben Col-0 auch die Mutanten *erf106* und *erf107* untersucht. Abbildung 4.19 (C) zeigt, dass die Genexpression von *ERF106* in der Mutante *erf106* im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert ist, während sie in den *erf107*-Pflanzen stark erhöht ist. Für *ERF107* zeigt sich dieses Ergebnis invertiert: die Genexpression ist bei der Mutante *erf107* gering, während *ERF107* in der *erf106*-Mutante deutlich stärker exprimiert wird. Dies zeigt eine gegenseitige Regulation von *ERF106* und *ERF107*, vermutlich als eine Art Ausgleichsreaktion auf den Verlust des jeweils anderen TF.

4.3.2 Analyse der differentiell exprimierten Gene in Funktionsverlust-Mutanten von *erf106* und *erf107* nach Überflutung

Es konnte gezeigt werden, dass Überflutung die Expression von *ERF106* und *ERF107* aktiviert. Bislang ist noch nicht bekannt, ob diese beiden TF einen Einfluss auf die Signaltransduktion in der Hypoxia-Antwort haben. Aus diesem Grund wurden in einer Transkriptom-Analyse (RNAseq) die entsprechenden Funktionsverlust-Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* nach Überflutung auf die, verglichen mit Wildtyp Col-0, DEG analysiert (Anhang Tab.8.9, 8.10, 8.11). Als Grenzwert wurde der Logarithmus \log_2 der Veränderung bei mindestens $-1,5$ bzw. $1,5$ festgelegt. Betrachtet man die so erhaltenen Daten, so gibt es in den Mutanten im Vergleich zu Col-0 kaum Veränderungen. Die Zahlen der durch Überflutung aktivierten Gene sind mit drei in *erf106*, zwei in *erf107* und ebenfalls drei in *erf106xerf107* sehr gering (Abbildung 4.20 (A)). Die durch Überflutung induzierten Antworten werden durch die Mutationen daher kaum beeinflusst. Bei den nach Hypoxia inhibierten Genen verhält es sich mit der Anzahl der DEG ähnlich (Abbildung 4.20 (B)). Zwei Gene in *erf106*, eines davon ist *ERF106*, die einzige Übereinstimmung mit der Doppelmutante, sieben bei *erf107*, eines davon ist *ERF107*, und 18 DEG in *erf106xerf107*. Von diesen 18 nur in der Doppelmutante differentiell exprimierten Genen sind sieben bereits im Grundzustand ohne Überflutungs-Stress reprimiert. Die elf verbleibenden Gene sind keiner bestimmten Genfamilie zuzuordnen, es handelt sich um eine Kinase, eine Phosphatase, ein an der Pathogen-Abwehr beteiligtes Gen und diverse Gene mit unbekanntem Funktionen. Auch an den Abwehrmechanismen nach Überflutungsstress sind diese Gene nicht beteiligt. Die Veränderungen in den Einzelmutanten sind demnach nur geringfügig.

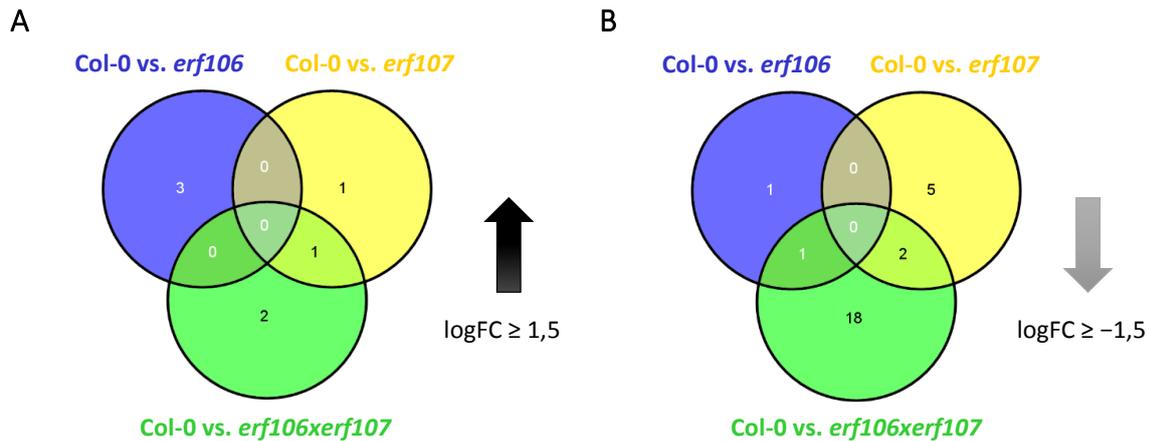


Abbildung 4.20 Venn-Diagramm der im Vergleich zu Wildtyp Col-0 differenziell exprimierten Gene in den Funktionsverlust-Mutanten nach Überflutung. (A) Die aktivierten Gene mit $\log_2FC \geq 1,5$ (B) Die inhibierten Gene mit $\log_2FC \geq -1,5$ ($p \leq 0,01$). Blau vergleicht Col-0 mit *erf106*, gelb Col-0 mit *erf107* und grün Col-0 mit *erf106xerf107*.

Die Übersicht in Tabelle 4.6 zeigt die Induktionswerte von verschiedenen Hypoxia-Antwort-Genen in den getesteten Mutationslinien (Licausi *et al*, 2010, 2011). Die Aktivierungsstärken in den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* unterscheiden sich nur geringfügig von den Werten im Wildtyp.

Tabelle 4.6 Induktionswerte (\log_2FC) von bekannten Hypoxia-Antwort-Genen nach Überflutungsstress im Wildtyp Col-0 und in den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* ($p \leq 0,01$).

Gen	At-Nummer	Col-0	<i>erf106</i>	<i>erf107</i>	<i>erf106xerf107</i>
HUP09	At5g10040	7,65	-	-	5,00
HRE1	At1g72360	4,10	3,00	3,99	3,99
SUS4	At3g43190	4,02	2,39	-	2,83
HB1	At2g16060	3,81	3,53	2,65	2,65
PDC1	At4g33070	3,42	2,16	-	2,71
HRE2	At2g47520	2,86	3,15	-	3,02
Rap2.2	At3g14230	1,98	2,09	2,02	2,02
HRA1	At3g10040	1,49	-	-	-
SUS1	At4g20830	1,42	1,66	1,86	1,86

Um große Datenmengen zu strukturieren und zu veranschaulichen, ist das mathematische Verfahren der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) sehr gut geeignet. Erstellt man eine PCA mit nachfolgender Clusteranalyse anhand der Daten der Transkriptom-Analyse, so werden die verschiedenen Replikate der einzelnen Linien auf ihre Gemeinsamkeiten hin untersucht. Abbildung 4.21 zeigt die PCA der Transkriptom-Daten aller Replikate von Col-0, *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107*

vor und nach Hypoxia-Behandlung. Aufgrund der Ähnlichkeit der Datensätze erfolgte die Aufteilung nach der Analyse in den Grundzustand links und die Proben nach Hypoxia rechts. Das zeigt erwartungsgemäß, dass die größten Unterschiede zwischen den gestressten und den nicht gestressten Proben liegen. Im Grundzustand unterscheiden sich Col-0, *erf106* und *erf107* nur wenig voneinander, *erf106xerf107* jedoch hebt sich deutlich von diesen drei Linien ab. Nach Hypoxia-Behandlung liegen die vier verschiedenen Linien wieder näher beieinander, was sich auch bei Betrachtung der bekannten Hypoxia-Antwort-Gene gezeigt hat. Mithilfe dieser Clusteranalyse wird auch die Qualität der Replikate deutlich, da die Wiederholungen der verschiedenen Linien die gleichen Tendenzen zeigen und es innerhalb der Genotypen nur geringfügige Schwankungen gibt. Die Mutation *erf106xerf107* hat demnach im Grundzustand einen größeren Einfluss auf das Transkriptom als nach Stress in Form von Hypoxia.

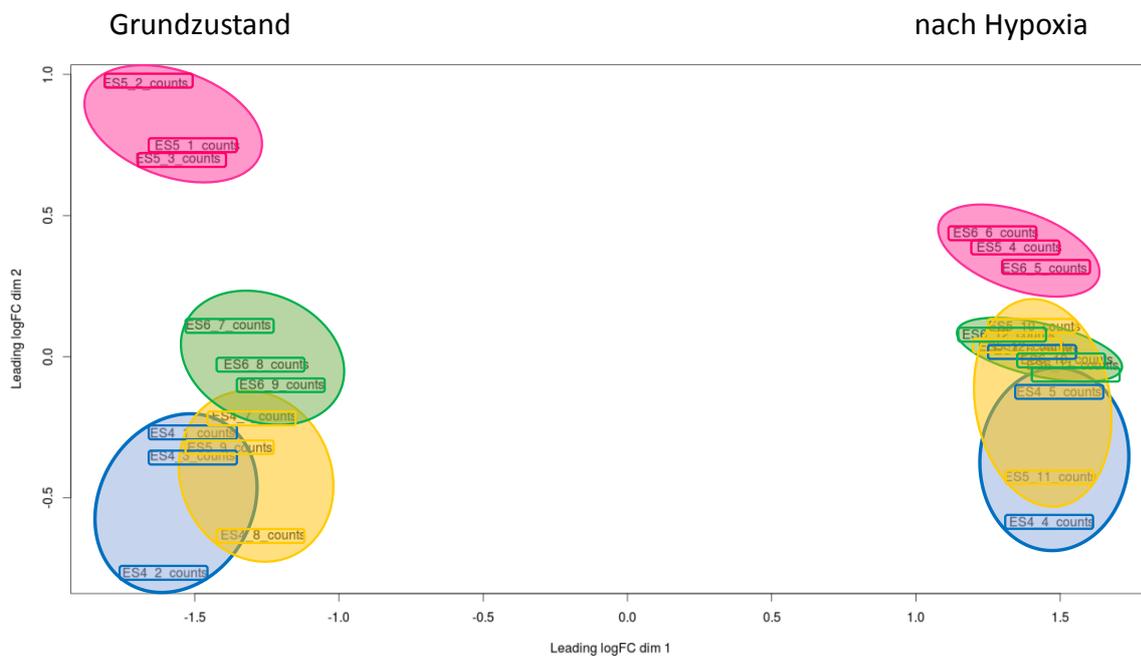


Abbildung 4.21 Hauptkomponentenanalyse (PCA) von Col-0, *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* nach Transkriptom-Analyse mittels RNAseq. Die zusammengehörenden Replikate sind farblich markiert. Col-0: blau, *erf106*: gelb, *erf107*: grün und *erf106xerf107* pink. Die Replikate aus dem Grundzustand erscheinen links, die Proben nach Hypoxia-Behandlung rechts im Diagramm.

4.3.3 Ermittlung der Überlebensrate von *erf106* und *erf107* Funktionsverlust-Mutanten nach Überflutung

ERF106 und *ERF107* werden beide durch Überflutung verstärkt exprimiert (Abbildung 4.19). Die Transkriptom-Analyse mit den Funktionsverlust-Mutanten hat nur geringfügige Unterschiede in der Hypoxia-Antwort in den einzelnen Mutanten gezeigt. Von den TF HRE1 und HRE2 ist bekannt, dass

durch den Verlust beider TF die Überlebensrate nach Sauerstoffmangel im Vergleich zu Col-0 signifikant niedriger ist (Licausi *et al*, 2010). Ob diese Tendenz auch in den Verlustmutanten von *ERF106* und *ERF107* zu erkennen ist, sollte weiterhin analysiert werden. Die Pflanzen wurden dazu in normalen Bedingungen (12h Licht / 12h Dunkel) für 10 Tage unter Wasser gesetzt. Nach einer Erholungsphase von zwei Wochen wurde die Überlebensrate ermittelt. Wie in Abbildung 4.22 dargestellt, sind die Überlebensraten von Wildtyp Col-0 (78%) und der Einzelmutante *erf106* (85%) etwas besser als die von *erf107* (44%) und *erf106xerf107* (43%). Die Unterschiede sind, wie nach den Transkriptom-Daten zu erwarten war, jedoch nicht signifikant. Die Antwort auf Hypoxia ist in den *loss-of-function*-Pflanzen von *ERF106* und *ERF107* demnach nicht deutlich beeinträchtigt.

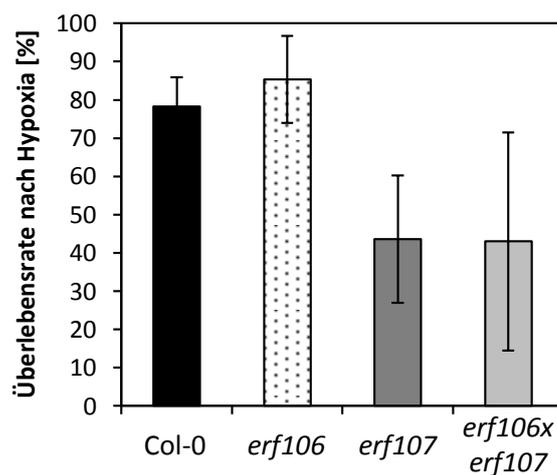


Abbildung 4.22 Die Mutation von *ERF106* und/oder *ERF107* hat keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate nach Überflutung. Überlebensrate von Pflanzen nach Überflutung. Dreieinhalb Wochen alte Pflanzen der Linien Col-0, *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* wurden für 10 Tage bei normalen Bedingungen (12h Licht / 12h Dunkel) unter Wasser gesetzt, und nach einer 14tägigen Erholungsphase wurde die Überlebensrate bestimmt (MW +SE aus drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils pro Linie ≥ 14 Pflanzen untersucht wurden, t-Test: zweiseitig, heteroskedatisch).

5 Diskussion

Aus der Literatur ist bekannt, dass 9-HOT zu einer Wellung der Wurzeln führt (Vellosillo *et al*, 2007). Dieser Phänotyp erwies sich in der Praxis als Agar-abhängig und nicht reproduzierbar. Konstant zeigte sich dagegen die Hemmung des Wurzelwachstums bei einer Konzentration von 25µM 9-HOT. Somit verhalten sich die Pflanzen auf dem C₉-Oxylipin 9-HOT ähnlich wie auf den C₁₃-Oxylipinen OPDA oder JA, die ebenfalls eine Hemmung des Wurzelwachstums induzieren (Staswick *et al*, 1992; Taki *et al*, 2005; Vellosillo *et al*, 2007). Die Ursache für diesen Effekt ist unbekannt, jedoch ist anzunehmen, dass die externe Gabe von Oxylipinen für die Pflanzen toxisch wirkt.

5.1 Der Transkriptionsfaktor TGA5 und das TGA-Zielgen *CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASE CYP81D11* ermöglichen besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylipin 9-HOT

Es war bislang nicht bekannt, ob die Überexpression eines TF auch auf 9-HOT zu normalem Wurzelwachstum führen kann. Dazu wurden zunächst die bZIP TF TGA2, TGA5 und TGA6 untersucht. Mutanten dieser TF zeigen auf Phytoprostan PPA1, OPDA und JA ein signifikant verkürztes Wurzelwachstum, während die Doppelmutante *tga1xtga4* ein mit dem Wildtyp Col-0 vergleichbares Wachstum zeigt (Stotz *et al*, 2013). Auch ist bekannt, dass durch OPDA und Phytoprostane Gene, die wichtig für Detoxifizierung, Stressantwort und Sekundärmetabolismus sind, in Abhängigkeit von TGA2, TGA5 und TGA6 aktiviert werden (Mueller *et al*, 2008). Es ist daher denkbar, dass auch die Antwort auf andere Oxylipine wie 9-HOT über TGA TF reguliert werden kann. Überexpression von TGA5 im Mutanten-Hintergrund (*tga256 35S:TGA5*) verbesserte das Wurzelwachstum auf 9-HOT. Durch TGA2 konnte dieser Effekt nicht erzielt werden (Abb. 4.1). Die Genexpression der TF TGA2, TGA5 und TGA6 unterscheidet sich laut der Genevestigator-Genexpressions-Datenbank nicht voneinander. Da die Hemmung des Wurzelwachstums auf 9-HOT durch TGA5-Überexpression nur teilweise revertiert werden kann, ist auch noch denkbar, dass TGA6 ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Zander *et al*. konnten 2010 weiterhin zeigen, dass die Überexpression von TGA5 die Expression des ERF TF *ORA59* und des *PLANT DEFENSIN* Gens *PDF1.2* induziert. *ORA59* ist in JA- und Ethylen-vermittelten Signalwegen beschrieben. Vermehrte Expression von *ORA59* erhöht die Resistenz gegenüber dem Pilz *Botrytis cinerea*, die Mutation dagegen erhöht die Anfälligkeit gegenüber biotischem Stress (Pré *et al*, 2008). JA und Ethylen spielen auch bei der Regulation von *PDF1.2* eine Rolle. Behandlung mit JA oder Ethylen induziert die Expression von *PDF1.2* (Penninckx *et al*, 1996, 1998). Besonders bei der Abwehr nekrotropher Pathogene wirken die JA und Ethylen-abhängigen Signalwege zusammen und aktivieren so Ziel-Gene wie *PDF1.2* (Zarei *et al*, 2011). Ein weiteres Ziel-Gen der TGA-TF ist die Cytochrom P450

Monooxygenase *CYP81D11* (Fode *et al*, 2008). In der Mutante *tga2xtga5xtga6* ist die Genexpression von *CYP81D11* nach OPDA-Behandlung stark reduziert (Stotz *et al*, 2013). *CYP81D11* wird außerdem durch Behandlung mit dem Phytoprostan PPA₁ verstärkt exprimiert (Mueller *et al*, 2008). Das bessere Wachstum auf 9-HOT durch vermehrte Expression von TGA5 lässt darauf schließen, dass die durch TGA5 induzierten Signalwege die Antwort auf 9-HOT regulieren. Somit sollte auch die Überexpression von TGA-Zielgenen das Wachstum auf 9-HOT verbessern. Dazu wurden Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten des direkten TGA-Ziel-Gens *CYP81D11* untersucht. Gemäß der Erwartung wuchsen die Wurzeln der 35S:*CYP81D11* Keimlinge auf dem Oxylin 9-HOT im Vergleich zum Wildtyp signifikant besser, die Mutante *cyp81d11* dagegen zeigte verkürztes Wurzelwachstum (Abb. 4.2). Somit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines TF (*TGA5*) sowie eines direkten Ziel-Gens (*CYP81D11*) das Wurzelwachstum auf 9-HOT verbessert. Ob dieser Effekt auch auf anderen Oxylinen beobachtet werden kann, ist bislang noch nicht bekannt. Die Funktion von *CYP81D11* ist ebenfalls noch nicht erforscht. Aufgrund der beobachteten Eigenschaften von *CYP81D11*-Funktionsgewinnmutanten ist es sehr wahrscheinlich, dass auch diese Cytochrom P450 Monooxygenase wie viele andere Gene dieser Familie an der Entgiftung von Fremdstoffen mitwirkt (Werck-reichhart & Feyereisen, 2000; Bela *et al*, 2015). Die Behandlung mit bekannten Xenobiotika und anschließende Messung der Abbau-Produkte könnte diese These weiter festigen. Es ist denkbar, dass durch *TGA5* und möglicherweise auch *TGA6* über *CYP81D11* die Detoxifikation von C₉-Oxylinen reguliert wird.

5.2 Die Überexpression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren kompensiert die Wurzelwachstums-hemmende Wirkung des Oxylipins 9-HOT

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von TF in 9-HOT vermittelten-Signalwegen. Dazu wurde das Wurzelwachstum von TF-überexprimierenden Pflanzen auf 9-HOT-haltigem Medium untersucht. In der *At*TORF-Ex-Kollektion liegen verschiedene 35S:TF-Linien vor (Weiste *et al*, 2007). Die untersuchten Kollektionen enthalten 25 bis 50 verschiedene TF aus den Gruppen bHLH, bZIP, ERF, MYB, NAC und WRKY. Aufgrund der Größenunterschiede der Kollektionen unterscheidet sich auch die erforderliche Anzahl an Pflanzen, die untersucht werden müssen, um mit einer Wahrscheinlichkeit von $p > 0,99$ jeden TF mindestens einmal zu prüfen. Die minimal erforderliche Pflanzen-Anzahl wurde daher mit 3 multipliziert, um statistisch gesehen jeden TF dreimal zu untersuchen. Durch diese Untersuchung der *At*TORF-Ex-Kollektion wurden insgesamt 81 verschiedene 35S:TF-Linien identifiziert, die 1 bis 5mal detektiert werden konnten. Die am häufigsten gefundenen TF-Familien waren dabei ERF mit 34 TF und bZIP mit 25 TF (Tabelle 8.1). Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurden nur TF näher analysiert, die mindestens 3mal gefunden wurden. Dennoch ist auch bei diesen TF die Überprüfung des Phänotyps auf 9-HOT mit Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten essentiell. Dass

Überexpression eines TF das Wurzelwachstum auf 9-HOT verbessern kann, bestätigt die Untersuchung der *At*TORF-Ex-Kollektion. Am häufigsten aus der Gruppe der bZIP TF wurden bZIP11, bZIP2 und bZIP8 gefunden. bZIP11 und bZIP2 werden der bZIP-Gruppe S1 zugeteilt. Sie sind sehr nahe miteinander verwandt und in ihrer Funktion redundant (Jakoby *et al*, 2002; Ehlert *et al*, 2006). Ebenfalls zu Gruppe S1 zählt der nahverwandte TF bZIP44, der zwar in der untersuchten bZIP-*At*TORF-Ex-Kollektion enthalten war, aber bei der Durchmusterung auf 9-HOT nicht gefunden wurde. Zudem wurden aus der bZIP-TF-Familie die bereits auf 9-HOT untersuchten TF TGA2 und TGA5 gefunden, was der Erwartung gemäß der bekannten Funktion dieser TF entspricht. Nahverwandte TF wurden auch aus der ERF-Familie mit den beiden TF ERF106 und ERF107 (jeweils fünfmal) gefunden. Betrachtet man alle gefundenen TF aus der ERF-Familie, so sind aus Gruppe IX die meisten ERF-TF gefunden worden. Neun verschiedene TF wurden insgesamt 18mal gefunden (Abb. 4.5) Dabei wurde auch ORA59 mit verbessertem Wurzelwachstum auf 9-HOT beobachtet, der wichtigste Regulator in der JA- und Ethylen-vermittelten Abwehr (Pré *et al*, 2008; Zander *et al*, 2010; Zarei *et al*, 2011). Dies deutet daraufhin, dass 9-HOT-induzierte Antworten ähnlich verlaufen können wie C₁₃-Oxylipin-vermittelte Reaktionen. Der Fund von nahverwandten TF, die in ihrer Funktion redundant sind, zeigt außerdem dass auch hinsichtlich 9-HOT durch die gefundenen TF ähnliche Signalwege reguliert werden. Zur weiteren Analyse wurde zum einen bZIP11 ausgewählt, zu dem es schon einige Studien gibt, und zum anderen die erst wenig charakterisierten TF ERF106 und ERF107. Die Zahl der TF-Kandidaten, die genauer charakterisiert werden sollten, wurde eingeschränkt, um diese TF bestmöglich analysieren zu können. Somit sollte anstatt der breitgefächerten Untersuchung vieler TF die detaillierte Erforschung weniger TF erfolgen. Die ausgewählten Kandidaten schienen aufgrund der schon bekannten Daten dazu am besten geeignet.

5.3 Der Funktionsverlust von Gruppe S-bZIP-Transkriptionsfaktoren ermöglicht besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylipin 9-HOT

Die untersuchten 35S:bZIP11-Linien aus der *At*TORF-Ex-Kollektion zeigten auf 9-HOT ein verbessertes Wurzelwachstum im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings ist bekannt, dass Überexpression von *bZIP11* das Wachstum der Pflanze insgesamt und damit auch das der Wurzel massiv beeinträchtigt (Hanson *et al*, 2008). Die Untersuchung der 35S:bZIP11-Linien zeigte dementsprechend verringerte Mengen an *bZIP11*-mRNA (Abb. 8.1). Dieser Effekt wird in der Literatur als Kosuppression bezeichnet und ist besonders häufig bei genetisch veränderten Pflanzen zu beobachten (Smyth, 1997; Depicker & Van Montagu, 1997; Queitsch *et al*, 2000). Der verwendete starke 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaikvirus führt zur verstärkten Transkription von mRNA, in diesem Fall von *bZIP11*. Die angesammelte mRNA führt über RNA-Interferenz zur Bildung doppelsträngiger RNA, die nachfolgend

abgebaut wird. Die vermeintliche Überexpression von bZIP11 wird dadurch verhindert. Die Untersuchung der β -Estradiol-induzierbaren Funktionsverlust-Mutanten XVE:amibZIP2/bZIP11/bZIP44 zeigte auf 9-HOT ein signifikant besseres Wurzelwachstum und bestätigte das Ergebnis der Durchmusterung. In der Literatur ist bekannt, dass bZIP11 zusammen mit bZIP2 und bZIP44 das Auxin-abhängige Wurzelwachstum reguliert (Weiste, 2011). Es ist daher anzunehmen, dass der Effekt durch bZIP11 bezüglich des Wurzelwachstums auf 9-HOT nicht Oxylin-spezifisch ist. Unter Energieverarmung wird das Wurzelwachstum bzw. die Meristemtätigkeit eingestellt (Pedrotti und Weiste, unveröffentlicht). In der Funktionsverlustmutante XVE:amibZIP2/bZIP11/bZIP44 kommt es trotz Energieverarmung wieder zu einem längeren Wurzelwachstum, weil die Auxin-abhängige Wuchskontrolle dereguliert ist (Pedrotti und Weiste, unveröffentlicht). Die Wuchskontrolle in der Tripelmutante ist demnach dereguliert, und durch Gabe von 9-HOT wird das Wurzelwachstum nicht mehr beeinflusst. 9-HOT könnte vielmehr als allgemeiner Stress von der Pflanze wahrgenommen werden. Die Untersuchung des Wurzelwachstums mit weiteren Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum haben, könnte diese These unterstützen. Da durch die *artificial micro RNA* in den verwendeten Funktionsverlust-Mutanten die Expression von bZIP2, bZIP11 und bZIP44 nicht vollständig ausgeschaltet wird, ist für weitere Untersuchungen der Gebrauch stabiler Mutanten anzuraten. Interessant ist auch die Betrachtung der Ziel-Gene von bZIP11. Ein potentielles Ziel-Gen ist die Lipoxygenase *LOX1*, die unter anderem die Umwandlung von Fettsäuren zu Fettsäurehydroperoxiden katalysiert, den Vorstufen von 9-HOT. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass die Überexpression von *bZIP11* in Protoplasten die mRNA-Spiegel von *LOX1* erhöht (Hanssen, 2009). Geht man davon aus, dass im Gegensatz dazu das Ausschalten von *bZIP11* auch die *LOX1*-Menge reduziert, könnte dies das gute Wachstum von bZIP11-Mutante auf 9-HOT erklären. Durch weniger *LOX1* wäre die endogene Konzentration an Oxylinen reduziert, wodurch die exogene Gabe besser toleriert werden könnte. Um diese These zu bestätigen, sind die Analyse der mRNA-Konzentration von *LOX1* sowie die Messung von Oxylinen in *bzip11*- und *lox1*-Mutanten erforderlich. Bei Richtigkeit dieser Hypothese würden *lox1*-Mutanten ebenfalls verbessertes Wurzelwachstum auf 9-HOT zeigen, und Funktionsgewinn-Mutanten wären beeinträchtigt.

5.4 Die Überexpression der Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 ermöglicht besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylin 9-HOT und aktiviert die Expression von Detoxifizierungs-Genen

Gemäß der phylogenetischen Einteilung aufgrund der Ähnlichkeit der Proteinstrukturen ist ERF106 der nächstverwandte TF zu ERF107 und umgekehrt. Beide TF sind der Gruppe IX zuzuordnen (Nakano *et al*, 2006). Die aufgrund der Verwandtschaft nächsten TF zu ERF106 und ERF107 sind ERF104 und

ERF105 und wurden auf 9-HOT jeweils einmal mit verbessertem Wurzelwachstum identifiziert (Tabelle 8.1) (Nakano *et al*, 2006). ERF104 und ERF105 sind bereits in der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion hinsichtlich Resistenz gegenüber dem Pilz *Verticillium longisporum* identifiziert worden (Iven, 2009). Auch Überexpression von ERF106 und ERF107 konnte in dieser Untersuchung eine vermehrte Resistenz gegenüber *Verticillium* vermitteln. Dass die Überexpression von nahverwandten TF die gleiche Reaktion hervorruft, deutet auf die Redundanz dieser TF. Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion wurde erneut das Wurzelwachstum von Funktionsgewinn-Mutanten von *ERF106* und *ERF107* untersucht. Für die Überexpression der TF wurde das induzierbare XVE-System genutzt. Dabei wird erst durch Gabe von β -Estradiol die vermehrte Expression der TF angeschaltet. In Abbildung 4.6. fällt auf, dass die Linie XVE-ERF106-1A auch unter Kontrollbedingungen ein leicht verlängertes Wurzelwachstum zeigt. Bei XVE-ERF106-4E ist kein Unterschied zur Kontrolle erkennbar. Da es sich dabei um genetisch unabhängige Linien handelt, ist anzunehmen, dass der in Col-0 Pflanzen transformierte XVE:TF-Genabschnitt an unterschiedlichen Stellen im Genom integriert wurde. Abhängig vom Insertionsort kann dies allein schon Auswirkungen auf das Wachstum haben, wenn durch die Integration des DNA-Bereichs andere, für das Wurzelwachstum wichtige, Gene beeinträchtigt werden (Zuo *et al*, 2000). Betrachtet man die Wurzellängen bei Gabe von β -Estradiol so sind, mit Ausnahme von XVE-ERF106-4E, die Wurzeln im Vergleich zum Wachstum ohne β -Estradiol um etwa 25-30% kürzer. Da auch die zur Kontrolle genutzten Leervektor-Pflanzen ein reduziertes Wurzelwachstum zeigen, ist davon auszugehen, dass nicht die vermehrte Expression der TF für diesen Effekt verantwortlich ist. Es ist anzunehmen, dass die Behandlung mit β -Estradiol die Pflanzen in Alarmbereitschaft versetzt und verstärkt der Abbau vorangetrieben wird. Ein Teil der zur Verfügung stehenden Energie steht daher nicht mehr für das Wachstum der Pflanzen bereit, und die Pflanzen sind etwas kleiner und die Wurzeln etwas kürzer als unter normalen Bedingungen. Für XVE-ERF106-4E zeigt sich bei β -Estradiol-Gabe ein verbessertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle. Dies deutet daraufhin, dass speziell die Überexpression von *ERF106* zu einem etwas verbesserten Wurzelwachstum führt. Vergleicht man dies mit dem Wachstum in Abbildung 4.9, so zeigt sich auch in diesem Experiment durch Induktion der Überexpression ein leicht verlängertes Wurzelwachstum. Die erhöhte Proteinmenge an ERF106 führt demnach zu der Verbesserung des Wurzelwachstums um etwa 20% verglichen mit dem Wachstum unter Kontrollbedingungen. Da ERF106 die Expression vieler Gene wichtig für Detoxifizierung und Stressabwehr aktiviert (Tabelle 4.5), ist es möglich, dass diese Pflanzen mit dem durch β -Estradiol und 9-HOT ausgelösten Stress besser umgehen können und somit auch stärker wachsen als die Kontrollpflanzen. Für eine genaue Analyse der hierfür wichtigen Ziel-Gene fehlen Informationen über die Metabolisierung von β -Estradiol. Laut der Literatur hat die Behandlung mit diesem Phyto-Östrogen keinerlei Auswirkungen auf das Wachstum oder die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana* (Zuo *et al*,

2000). Auch das Moos *Physcomitrella patens* ist im Wachstum nach β -Estradiol-Behandlung nicht beeinträchtigt (Kubo *et al*, 2013). Bei *Oryza sativa* ist bekannt, dass β -Estradiol-Gabe die Ausbildung von Wurzelhaaren fördert (Okuzaki *et al*, 2011). In der Kichererbse wiederum ist gezeigt, dass β -Estradiol das Wachstum von Wurzel und Spross verstärkt (Erdal & Dumlupinar, 2010). Im Hinblick auf die sehr verschiedenen Pflanzen sind die Ergebnisse nicht direkt auf *Arabidopsis* übertragbar. Dennoch bestätigen diese Studien den Einfluss der Substanz auf das pflanzliche Wachstum. Da die inhibitorische Wirkung von 9-HOT sehr deutlich ist (nur noch 20% der ursprünglichen Wurzellänge), zeigt sich ein signifikanter, wachstumsfördernder Effekt ausgelöst durch die Überexpression von ERF106 bzw. ERF107. Diese Steigerung des Wurzelwachstums zeigt sich nicht nur auf 9-HOT, sondern auch bei 9-KOT, einem weiteren C₉-Oxylin, sowie auf der Chemikalie TIBA, die den Auxin-Transport hemmt (Abbildung 4.9). Für die Herstellung der XVE:ERF106-Pflanzen wurde das Vollängen-Gen von ERF106 verwendet. Diese Funktionsgewinn-Mutanten zeigen auf 9-HOT den gleichen Phänotyp wie die N-terminal verkürzten 35S:ERF106-Linien, die aus der AtTORF-Ex-Kollektion untersucht wurden. Für die Antwort auf 9-HOT sind die N-terminalen Aminosäuren von ERF106 demnach nicht essentiell. Untersuchungen auf JA und OPDA haben nur für OPDA eine minimale Verbesserung des Wurzelwachstums durch vermehrte Expression von *ERF106* ergeben (Abbildung 8.3). Verglichen mit den Reaktionen auf 9-HOT und 9-KOT ist dieser Effekt vernachlässigbar gering. Daher ist anzunehmen, dass die durch ERF106 und ERF107 regulierten Signalwege in der Antwort auf 9-HOT unabhängig von JA-induzierten Signalwegen sind. TIBA induziert im Wildtyp Col-0 die Expression von *CYP81D11*, nicht jedoch in *coi1*-Mutanten, in denen die JA-Signalwege blockiert sind (Köster *et al*, 2012). Ähnlich verhält sich *DIN11*, eine durch Dunkelheit induzierte Oxidoreduktase (Fujiki *et al*, 2001). Die Expression von *DIN11* kann in Mutanten ohne JA-Signalweg (*dde2*, *coi1*) nicht mehr induziert werden, die Produktion von JA ist aber nicht beeinflusst (Köster *et al*, 2012). *DIN11* ist vor allem deswegen interessant, da es von beiden ERF TF induziert wird (ERF106: log₂FC 6,995, ERF107: log₂FC 1,584, siehe auch Tabellen 8.5 und 8.6). Von *DIN11* ist weiterhin bekannt, dass es auch durch Chemikalien induziert wird, die oxidativen Stress auslösen (Gadjev *et al*, 2006). Neben *DIN11* werden noch zahlreiche weitere Gene durch Ozon oder Methylviologen verstärkt exprimiert, darunter Glutathion-S-Transferasen (GST), UDP-Glukosyltransferasen (UGT) oder Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP). Besonders interessant ist dabei, dass von den 27 Genen, die am stärksten durch oxidativen Stress induzierende Chemikalien (Ozon, Methylviologen, *Alternaria alternata* Toxin, 3-Aminotriazol) induziert wurden, über die Hälfte auch durch ERF106 bzw. ERF107 hochreguliert werden. Von diesen 27 Genen werden acht nur durch ERF107 und sechs durch ERF106 und ERF107 verstärkt exprimiert (Abb. 5.1 und Tabellen 8.12 und 8.13). Durch ERF106 und ERF107 werden demnach auch Antworten aktiviert, die besonders nach oxidativem Stress angeschaltet werden. Da durch oxidativen Stress auch die Bildung von Oxylinen gefördert wird, führt die Aktivierung von Stress-Abwehrgenen durch Überexpression von ERF106 und

ERF107 zu besserem Wachstum auf 9-HOT (Mueller & Berger, 2009). Oxidativer Stress kann auch durch Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ verursacht werden. Die Chemikalie Bengalrosa führt zur Bildung von $^1\text{O}_2$ und damit zu massiven Veränderungen in der Genexpression im Wildtyp Col-0 (López *et al*, 2011). In *lox1xlox5* Mutanten, die auf enzymatischem Weg keine C₉-Oxylipine mehr produzieren können, sind die Hälfte der durch Rose Bengal induzierten Gene mindestens zweifach weniger stark induziert. Weiterhin zeigt diese Mutante eine höhere Anfälligkeit gegenüber Singulett-Sauerstoff und Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* sowie nach Pathogen-Infektion vermehrte Produktion von Malondialdehyd, einem Marker für erhöhte Lipidperoxidation (López *et al*, 2011; Farmer & Davoine, 2007). Der in der Literatur beschriebene 9-HOT abhängige *root waving* Phänotyp wird nach Gabe von Trolox nicht mehr ausgebildet (López *et al*, 2011; Vellosillo *et al*, 2007). Trolox ist ein Tokopherol, ein Vitamin E-Derivat, das die Lipidperoxidation mindert indem es verschiedene Radikale sowie $^1\text{O}_2$ unschädlich macht (Girrotti, 1998; Sattler *et al*, 2004; Triantaphylidès & Havaux, 2009). Dies zeigt, dass C₉-Oxylipine wie 9-HOT Einfluss auf die Antwort auf oxidativen Stress, Lipidperoxidation und Pathogenabwehr haben.

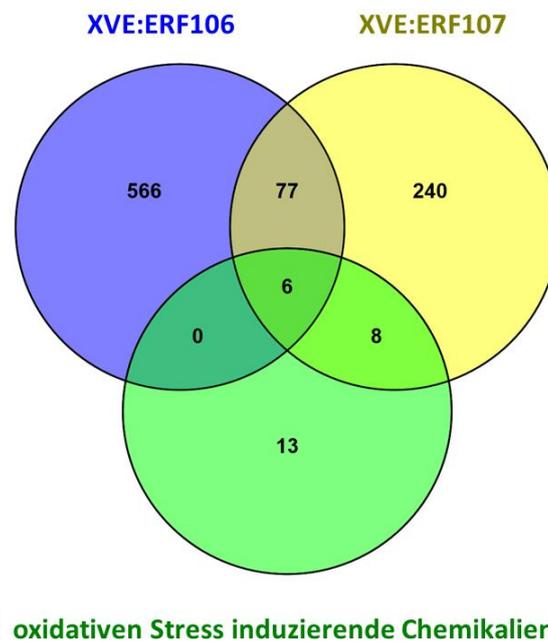


Abbildung 5.1 ERF106 und ERF107 aktivieren durch oxidativen Stress regulierte Gene. Das Venn-Diagramm zeigt die Übereinstimmungen der differentiell exprimierten, aktivierten Gene ($\log_2\text{FC} \geq 1,0$ mit $p \leq 0,01$) in den Funktionsgewinn-Mutanten XVE:ERF106 (blau) und XVE:ERF107 (gelb) sowie nach Behandlung mit verschiedenen Chemikalien, die oxidativen Stress induzieren (Ozon, Methylviologen, *Alternaria alternata* Toxin, 3-Aminotriazol) aus (Gadjev *et al*, 2006) (grün).

Dass die Überexpression von ERF106 und ERF107 einerseits das Wachstum auf 9-HOT verbessert, und andererseits auch Gene aktiviert, die auch bei oxidativem Stress angeschaltet werden, bestätigt diese

Annahme. Da 9-HOT die Produktion von ROS auslöst (Vellosillo *et al*, 2007), erklärt sich auch das bessere Wachstum von ERF106- und ERF107-Funktionsgewinn-Mutanten auf 9-HOT, die Gene zur Bewältigung von oxidativem Stress anschalten. Vermutlich wird dadurch 9-HOT schneller abgebaut bzw. unschädlich gemacht, so dass der Stress für die Pflanzen geringer ist und sie besser wachsen. Zur Überprüfung dieser Theorie ist es sinnvoll, die 9-HOT-Konzentration sowie die Mengen anderer Oxylipine wie 9-KOT, OPDA und JA in ERF106- und ERF107-Funktionsgewinn-Mutanten mit denen in Col-0 nach dem Wachstum auf dem Oxylin und Ausbildung des Phänotyps zu vergleichen. Auch denkbar ist die verringerte Bildung von endogenen ROS und somit weniger Stress insgesamt für die Pflanze, was zur besseren Bewältigung von exogenem Stress in Form von 9-HOT oder 9-KOT führt. Die Funktionsverlust-Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* zeigen auf 9-HOT ein mit Col-0 vergleichbares Wachstum (Abb. 4.8). Der Verlust von einem oder beiden TF führt demnach hinsichtlich des Wurzelwachstums nicht zu Einschränkungen. Es ist daher anzunehmen, dass die direkt durch 9-HOT aktivierten Signalwege unabhängig von ERF106 und ERF107 sind, da es in den Funktionsverlust-Mutanten sonst zu gravierenderen Auswirkungen kommen müsste. Die Transkriptom-Analyse der ERF-Mutanten bestätigt diese Annahme. Durch den Verlust von ERF106 oder ERF107 kommt es wahrscheinlich aufgrund der Redundanz beider TF nur zu minimalen Veränderungen in der Genexpression (Tab. 4.2-4.4, Abb. 4.10, Tab. 8.2-8.4). Wurden beide TF ausgeschaltet, so zeigen sich stärkere Veränderungen in den differentiell exprimierten Genen. Verglichen mit anderen Experimenten jedoch sind die Änderungen auch hier nur schwach (Abb. 4.10 und 4.12). Da die Doppelmutante *erf106xerf107* auf 9-HOT keinen Effekt hinsichtlich Wurzelwachstums gezeigt hat (Abb. 4.8), wurde auf die Untersuchung von 9-HOT behandelten Pflanzen in der Transkriptom-Analyse verzichtet. Neben ERF106 und ERF107 wurden auch die beiden nächstverwandten TF ERF104 und ERF105 in der Untersuchung der *AtTORF*-Ex-Kollektion auf 9-HOT gefunden und darüber hinaus vermitteln diese auch eine vermehrte Resistenz gegenüber *Verticillium longisporum* (Tabelle 8.1 und Iven, 2009). Da es in der Doppelmutante *erf106xerf107* auf transkriptioneller Ebene nur schwache Änderungen gibt, kann davon ausgegangen werden, dass diese vier TF redundante Funktionen haben. Um diese Theorie zu überprüfen, können Untersuchungen einer Tripel- oder Quadrupel-Mutante (*erf104xerf105xerf106xerf107*) das Ziel weiterer Forschung sein.

5.5 Die Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 beeinflussen die Genexpression verschiedener Gene der Eisen-Aufnahme-Regulation

Sehr interessant ist die Aktivierung der vier TF *bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100* und *bHLH101* in der Doppelmutante *erf106xerf107* im Vergleich zum Wildtyp (Abb.5.2). Diese TF sind wichtig für die Regulation der Eisenmangel-Antworten in *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al*, 2007). Das eigentlich

reichlich im Boden vorhandene Eisen liegt unter alkalischen Bedingungen zu einem Großteil in der oxidierten Form (Fe(III)) vor und ist als solche nur schlecht löslich. Pflanzen wie *Arabidopsis* haben daher verschiedene Strategien entwickelt, um mehr Eisen aufnehmen zu können. Dazu zählt die Ansäuerung des Bodens durch Aktivierung der AHA2-Protonenpumpe (Santi & Schmidt, 2009), die Reduktion des Eisens in der Rhizosphäre durch die Membran-gebundene Reduktase FRO2 (Robinson *et al*, 1999) und die Aufnahme des durch FRO2 entstandenen Fe(II) über den Transporter IRT1 (Vert *et al*, 2002). Ein sehr wichtiger Regulator für die Eisenaufnahme ist der bHLH-TF FIT (FER-like IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR), vormals bekannt als FIT1 oder FRU (Colangelo & Guerinot, 2004; Bauer *et al*, 2007; Jakoby *et al*, 2004). FIT reguliert die Expression von FRO2 und IRT1 (Colangelo & Guerinot, 2004; Jakoby *et al*, 2004). Weiterhin wichtig ist die Untergruppe Ib der bHLH TF, die aus *bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100* und *bHLH101* besteht (Wang *et al*, 2013; Maurer *et al*, 2014). Die Expression dieser Gene wird bei Eisenmangel aktiviert, aber unabhängig von *FIT* (Wang *et al*, 2007). *bHLH038* und *bHLH039* dimerisieren mit *FIT* (Yuan *et al*, 2008). *bHLH100* und *bHLH101* regulieren keine *FIT*-Ziel-Gene, sind aber wichtig für die Eisenverteilung in der Pflanze (Sivitz *et al*, 2012). Methyl-Jasmonat hemmt die Genexpression von FRO2 und IRT1 unabhängig von *FIT* (Maurer *et al*, 2011). Besonders auffällig ist die Aktivierung der bHLH-TF in der Funktionsverlust-Mutante *erf106xerf107* sowie die Hemmung der Genexpression durch die Überexpression von *ERF106* und *ERF107*. Außerdem kommt es im Wildtyp Col-0 zur Hemmung von *bHLH038* und *bHLH100* nach Hypoxia-Stress. Dies bestätigt zum Teil die Ergebnisse von García *et al*. die 2014 gezeigt haben, dass Hypoxia die Expression von Eisen-Aufnahme-Genen wie *FRO2*, *IRT1* und *FIT* beeinträchtigt.

	XVE:ERF106	XVE:ERF107	Col-0 Hypoxia	<i>erf106</i> Hypoxia	<i>erf107</i> Hypoxia	<i>erf106x107</i> Hypoxia	<i>erf106x erf107</i>
<i>bHLH038</i>	-	↓ -2,5	↓ -2,6	-	↓ -2,1	↓ -4,5	↑ 2,6
<i>bHLH039</i>	↓ -1,6	↓ -2,0	-	↓ -1,6	-	↓ -2,6	↑ 2,6
<i>bHLH100</i>	↓ -2,3	↓ -2,4	↓ -2,7	↓ -3,8	↓ -2,8	↓ -6,4	↑ 3,3
<i>bHLH101</i>	-	↓ -1,7	-	↓ -2,8	↓ -1,7	↓ -1,8	↑ 1,4
<i>IRT1</i>	↓ -3,3	↓ -1,5	-	-	-	-	-
<i>FRO2</i>	↓ -2,0	↓ -1,5	-	-	-	-	-
<i>FIT</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>CTR1</i>	↑ 1,2	↑ 0,4	↑ 1,9	↑ 1,6	↑ 1,7	↑ 1,5	-
<i>ETO1</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>RD20</i>	-	-	↓ -3,2	↓ -3,2	↓ -3,8	↓ -2,8	-

Abbildung 5.2 Funktionsgewinn bzw. Funktionsverlust von *ERF106* bzw. *ERF107* beeinflusst die Genexpression verschiedener Gene der Eisen-Aufnahme-Regulation. Beschrieben sind die TF *bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100*, *bHLH101* sowie der Eisentransporter *IRT1*, die Eisen-Reduktase *FRO2*, der TF *FIT*, sowie die negativen Regulatoren der Ethylen-Biosynthese *CTR1* und *ETO1* und die Peroxygenase *RD20*. Gezeigt sind nur die Werte (\log_2FC) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ aus den Transkriptom-Analysen nach vermehrter Expression von *ERF106* bzw. *ERF107* (XVE:ERF106, XVE:ERF107), nach Überflutung (Hypoxia) bzw. Vergleich der Funktionsverlust-Mutante *erf106xerf107* mit Col-0. Der Farbverlauf von grün (stark induziert) nach rot (stark gehemmt) sowie die Pfeile verdeutlichen die Expressionswerte.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Veränderung der Genexpression von Eisen-Aufnahme-Genen nach Hypoxia in der konstitutiven Ethylen-Mutante *ctr1* nicht stattfindet (García *et al*, 2014). In der Mutante *ctr1* sind die Ethylen-Antworten konstitutiv angeschaltet (Guo & Ecker, 2003; Huang *et al*, 2003). Dies ist insofern interessant, da bereits für die zwei 9-HOT insensitiven Mutanten *ctr1-15* und *eto1-14* eine vermehrte Ethylen-Produktion ermittelt wurde (López *et al*, 2011). Zudem zeigt auch der Wildtyp Col-0 nach Gabe des Ethylen-Vorläufers ACC (1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure) keinen Phänotyp auf 9-HOT (López *et al*, 2011). *CTR1* wird in den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* nach Hypoxia nur geringfügig schwächer als im Wildtyp induziert. Durch Überexpression von *ERF106* und *ERF107* wird *CTR1* leicht verstärkt exprimiert (\log_2FC 1,180 bzw. 0,390). Da *CTR1* die Ethylen-Biosynthese hemmt (Guo & Ecker, 2003) und durch *ERF106* und *ERF107* leicht induziert wird, ist anzunehmen, dass das bessere Wachstum der Funktionsgewinn-Mutanten auf 9-HOT nicht durch eine erhöhte Konzentration an Ethylen ausgelöst wird. Zudem ist Ethylen an der positiven Regulierung vieler Eisen-regulierter Gene in *Arabidopsis* beteiligt (García *et al*, 2010). Durch vermehrte Expression der untersuchten ERF TF wird die Expression dieser Gene aber gehemmt. Dies spricht ebenfalls gegen eine erhöhte Ethylen-Produktion in *ERF106* und/oder *ERF107* Überexpressions-Pflanzen. Messungen des Ethylens in diesen Mutanten könnten diese Annahme bestärken.

RD20 (RESPONSIVE TO DESSICATION 20 oder Caleosin) wirkt als Peroxygenase mit Spezifität für Fettsäure-Hydroperoxide (Blée *et al*, 2014). Die Überexpression von RD20 führt in *Arabidopsis* zur Akkumulation von 13-HOT und zu einer höheren ROS-Konzentration. Wird die aktive Peroxygenase vermehrt exprimiert, so werden nach Behandlung mit Bengalrosa oder Methylviologen weniger Anthocyane gebildet. Wird dagegen eine enzymatisch inaktive Punktmutante von RD20 überexprimiert, so erhöht sich die Konzentration an Anthocyanen (Blée *et al*, 2014). RD20 benötigt für die Peroxygenase-Aktivität Eisen (Blée *et al*, 2014). Auch Lipoxygenase-Enzyme enthalten ein Eisen-Molekül und brauchen dieses für die Enzymaktivität (Pistorius & Axelrod, 1974; Funk *et al*, 1990; Boyington *et al*, 1993). Gezeigt ist dies für humane LOX-Enzyme und für Proteine aus der Sojabohne, aufgrund der konservierten Funktion kann dies jedoch auch für *Arabidopsis* angenommen werden (Umate, 2011). Sowohl RD20 als auch LOX katalysieren die Entstehung von 9-HOT bzw. der Vorläufer-Verbindung 9-HPOT und benötigen dazu ein Eisen-Atom. Überexpression von *ERF106* und *ERF107* ermöglicht Pflanzen ein besseres Wachstum auf 9-HOT, führt aber zur Hemmung der Expression von Eisen-Aufnahme-Genen, während diese in der *erf106xerf107* Doppelmutante aktiviert werden (Abb. 5.2). Daher ist es wahrscheinlich, dass über die Eisen-Menge in ERF-Überexpressionspflanzen die Aktivität der Enzyme posttranskriptionell beeinflusst wird. Auf transkriptioneller Ebene wird RD20 durch Überflutung unabhängig von *ERF106*- bzw. *ERF107*-Abwesenheit gehemmt. Überexpression der TF hat keinen Einfluss auf die Expression von RD20 (Abb. 5.2). Dies spricht für die Annahme, dass die Oxylin-Konzentrationen in den ERF-Funktionsgewinn-Mutanten geringer sind und folglich ein

besseres Wachstum auf 9-HOT möglich ist. Zur weiteren Klärung der Regulationsmechanismen könnten auch hier Oxylin-Messungen und Messungen des Eisen-Gehalts in den Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten von ERF106 und ERF107 beitragen, sowie die Bestimmung der LOX-Aktivität in diesen Pflanzen. Des Weiteren wäre die Untersuchung der *bhlh*-Tripelmutante (*bhlh039xbhlh100xbhlh101* bzw. *3xbhlh*) hinsichtlich des Wurzelwachstums auf 9-HOT hilfreich. Für die ERF-Überexpressionspflanzen wurde sowohl besseres Wachstum auf 9-HOT als auch geringere *bHLH*-Transkriptmengen gezeigt. Spielt die Regulation des Eisen-Haushalts in diesem Zusammenhang eine Rolle, ist es wahrscheinlich, dass auch die *3xbhlh*-Mutante auf 9-HOT ein verlängertes Wurzelwachstum zeigt. Eisen-Mangel-Symptome wie Chlorose wurden in den Funktionsgewinn-Mutanten der ERF-TF bislang aber nicht beobachtet. Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen 9-HOT und Eisen-Aufnahme bedarf es weitere Untersuchungen.

5.6 Die Überexpression der Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 aktiviert die Genexpression von bekannten Stressabwehr-Genen

Zur Identifikation von Ziel-Genen von ERF106 und ERF107 wurden Transkriptom-Analysen der induzierbaren Überexpressions-Pflanzen durchgeführt. Dies führt zu massiven Veränderungen in der Pflanze (Abb. 4.12). Die Anzahl der DEG in XVE:ERF107-Pflanzen ist geringer im Vergleich zu XVE:ERF106. Dies erklärt sich durch die nur geringfügig verstärkte Expression von *ERF107* in diesen Pflanzen (\log_2FC 0,613, Abb. 8.4). Die Ergebnisse insbesondere für ERF107 müssen mit Pflanzen mit höheren Expressionsleveln von *ERF107* überprüft werden. Dennoch kommt es auch durch die recht schwache Überexpression von *ERF107* noch zu zahlreichen Veränderungen in der Genexpression. Durch beide TF werden neben Genen für die Signalübertragung (TF, Rezeptoren, Kinasen) besonders viele Detoxifizierungs-Gene aktiviert (Tabelle 4.5). Analog dem menschlichen Stoffwechsel erfolgt auch in Pflanzen die Entgiftung von Fremdstoffen in drei Phasen (Sandermann, 1987, 1992; Cole, 1994). Nach der Aufnahme des Stoffes wird dieser in Phase I durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse aktiviert. Diese Reaktionen werden durch Peroxidasen oder Cytochrom P450 Monooxygenasen katalysiert (Werck-reichhart & Feyereisen, 2000; Bela *et al*, 2015). In Phase II erfolgt die Konjugation von funktionellen Gruppen wie Glutathion oder Glucose an das Xenobiotikum. Dazu sind Enzyme wie UDP-Glykosyltransferasen oder Glutathion-S-Transferasen in der Lage (Hou *et al*, 2004; Richman *et al*, 2005; Bowles *et al*, 2005; Dixon *et al*, 2010; Marrs, 1996; Ross *et al*, 2001; Labrou *et al*, 2015). In der dritten und letzten Phase wird das Xenobiotika-Konjugat entweder in der Vakuole abgelagert oder aus der Zelle geschleust (Martinoia *et al*, 2007; Kang *et al*, 2010). Die Aktivierung von Genen, welche wichtig für alle drei Phasen der Entgiftung sind, unterstützt die Vermutung, dass durch Überexpression von *ERF106* und *ERF107* die Bewältigung von Xenobiotika optimiert wird. Obwohl durch

Überexpression von *TGA5* und *CYP81D11* ebenfalls eine Verbesserung des Wurzelwachstums auf 9-HOT beobachtet wurde, werden diese Gene nicht durch ERF106 oder ERF107 signifikant reguliert. Auch die Expression von *TGA2* und *TGA6* wird durch die beiden ERF-TF nicht verändert. Interessanterweise werden jedoch die TGA5-Zielgene *ORA59* und *PDF1.2* (Zander *et al*, 2010) nach *ERF106*-Überexpression verstärkt exprimiert (*ORA59* log₂FC 1,675, *PDF1.2* log₂FC 7,107, siehe auch Tabelle 8.5). Hier kommt es demnach zu einer TGA5-unabhängigen Regulation von *ORA59* und *PDF1.2*. Besonders für ERF106 sind auffallend viele weitere PLANT DEFENSIN-Gene nach Überexpression aktiviert, darunter *PDF1.3*, *PDF1.2c*, und *PDF1.2b*. *PDF1.2* wird besonders nach Pathogen-Befall durch den Pilz *Alternaria brassicicola* vermehrt produziert (Thomma *et al*, 1998; Penninckx *et al*, 1996).

Neben den Genen für die Stressabwehr sind auch auffallend viele Gene, welche wichtig für die Camalexin- und Indol-Glukosinolat-Biosynthese sind, vermehrt transkribiert (Abb. 4.13). Von den aus Tryptophan gebildeten Indol-Glukosinolaten ist bekannt, dass sie bei der Abwehr von Herbivoren gebildet werden (Müller *et al*, 2010), für die Immunabwehr wichtig (Bednarek *et al*, 2009; Clay *et al*, 2009) sowie an der Abwehr gegen Blattläuse beteiligt sind (Kim & Jander, 2007; de Vos *et al*, 2008; Kim *et al*, 2008). Camalexin ist das wichtigste Phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* und wird zur Abwehr gegen nekrotrophe Pilze wie *Botrytis cinerea* gebildet (Kliebenstein *et al*, 2005; Ferrari *et al*, 2007). Indol-Glukosinolate werden zur Abwehr von Insekten verwendet oder ebenfalls gegen pathogene Pilze eingesetzt (Grubb & Abel, 2006; Bednarek *et al*, 2009; Clay *et al*, 2009). Es gibt über 200 verschiedene Glukosinolate, ihre Kernstruktur ist immer gleich (Clarke, 2010). Der Biosyntheseweg für Indol-Glukosinolate und Camalexin ist sehr gezielt reguliert (Zhao & Last, 1996; Iven *et al*, 2012). Die Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP79B2 und CYP79B3 können Tryptophan zu Indol-3-Acetaldoxim umwandeln. Indol-3-Acetaldoxim kann nun durch CYP83B1, CYP81F2 und PEN2 über Zwischenprodukte zu Indol-Glukosinolaten umgewandelt werden (Bednarek *et al*, 2009). Auf der anderen Seite können CYP71A12, CYP71A13, GSTF6 und PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (PAD3) Indol-3-Acetaldoxim zu Camalexin umformen (Böttcher *et al*, 2009). In beiden Fällen ist der letzte Schritt entscheidend und wird streng reguliert (Bednarek *et al*, 2009; Böttcher *et al*, 2009). Diese Schritte werden von CYP81F2 und PAD3 katalysiert (Schuhegger *et al*, 2006). Es ist bekannt, dass die *cyp79b2xcyp79b3* Doppelmutante, die weder Camalexine noch Indol-Glukosinolate produzieren kann, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Pilz *Verticillium longisporum* zeigt (Iven *et al*, 2012). Weiterhin wurde beschrieben, dass Pflanzen, die *ERF104*, *ERF105* sowie *ERF106* und *ERF107* überexprimieren, gegen *Verticillium* resistenter sind als Wildtyp Col-0 (Iven, 2009). Ob dieser Effekt auf eine erhöhte Konzentration an Camalexin und/oder Indol-Glukosinolaten zurückzuführen ist, ist bislang nicht bekannt. Vergleicht man die Transkriptom-Analysen nach *Verticillium*-Infektion und Überexpression von *ERF106* und *ERF107*, so zeigen sich besonders für die aktivierten Gene deutliche Übereinstimmungen (Abbildung 5.3 und Tabellen 8.14, 8.15, 8.16 und 8.17). Von 342 nach Pilz-

Infektion aktivierten Genen werden 51 bzw. 71 auch durch ERF106 bzw. ERF107 aktiviert. 25 der Gene werden sogar durch beide TF und Infektion aktiviert, darunter *CYP81F2*, *PAD3*, fünf Glutathion-S-Transferasen, *MYB15* und *NAC042*. Der TF *NAC042*, auch *JUNGBRUNNEN1* genannt, vermittelt Toleranz bei verschiedenen abiotischen Stressen, verringert die intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration und verlängert die Lebensdauer der Pflanzen (Wu *et al*, 2012; Shahnejat-Bushehri *et al*, 2012). Auch die Bedeutung von *NAC042* in der Regulation der Camalexin-Biosynthese wurde bereits nachgewiesen (Saga *et al*, 2012).

Kürzlich wurde zudem ein neuer Zweig des Indol-Metabolismus entdeckt (Rajniak *et al*, 2015). Demzufolge entstehen neben Camalexin und Indol-Glukosinolaten auch Indol-3-Carbonylnitril (ICN) sowie die hydroxylierte Form 4-Hydroxyl-indol-3-carbonylnitril (4-OH-ICN). Die Biosynthese dieser Verbindungen wird durch die Cytochrom P450 Monooxygenase *CYP82C2* (At4g31970) und die Flavin-abhängige Oxidoreduktase *FOX1* (At1g26380) katalysiert (Rajniak *et al*, 2015). Interessanterweise finden sich diese Gene in der Transkriptom-Analyse der XVE-ERF107-Pflanzen unter den am stärksten aktivierten Genen. Für *CYP82C2* liegt der \log_2FC -Wert bei 6,6 und für *FOX1* bei 5,8. Es ist daher denkbar, dass ERF107 die Biosynthese dieser neuen Verbindungen reguliert. Die Analyse der Konzentrationen von ICN und 4-OH-ICN in ERF107 Funktionsgewinn- und Funktionsverlust-Mutanten könnte dies bestätigen.

ERF TF binden an GCC-Boxen oder ähnliche Elemente, die besonders in den Promotoren von JA/Ethylen-induzierten oder PR Genen wie PDF1.2 enthalten sind (Oñate-Sánchez *et al*, 2007; Fujimoto *et al*, 2000; Ohta *et al*, 2001; Brown *et al*, 2003; Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Zur genaueren Analyse der Regulation durch ERF106 und ERF107 wurde mit Hilfe der Online-Datenbanken für TF-Bindestellen AGRIS und AthaMap nach ERF-Bindestellen in den putativen Ziel-Genen gesucht (Davuluri *et al*, 2003; Galuschka *et al*, 2007; Bülow *et al*, 2009, 2010). Während die Datenbank AGRIS nur für *ORA59*, *GSTF6* und *RD20* Bindestellen für AP2/ERF (ERF) TF aufzeigt, enthalten laut AthaMap mehr als die Hälfte der analysierten Gene Bindestellen für ERF-TF (Tabelle 8.18). Die Vorhersage von TF-Bindestellen gibt jedoch keinerlei Aufschluss darüber, ob das entsprechende Gen tatsächlich durch TF der ERF-Gruppe reguliert wird. Um das nachzuweisen, sind Untersuchungen mit Transformations-Analysen in Protoplasten und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) notwendig. Zudem ist auch eine indirekte Regulation eines Gens möglich.

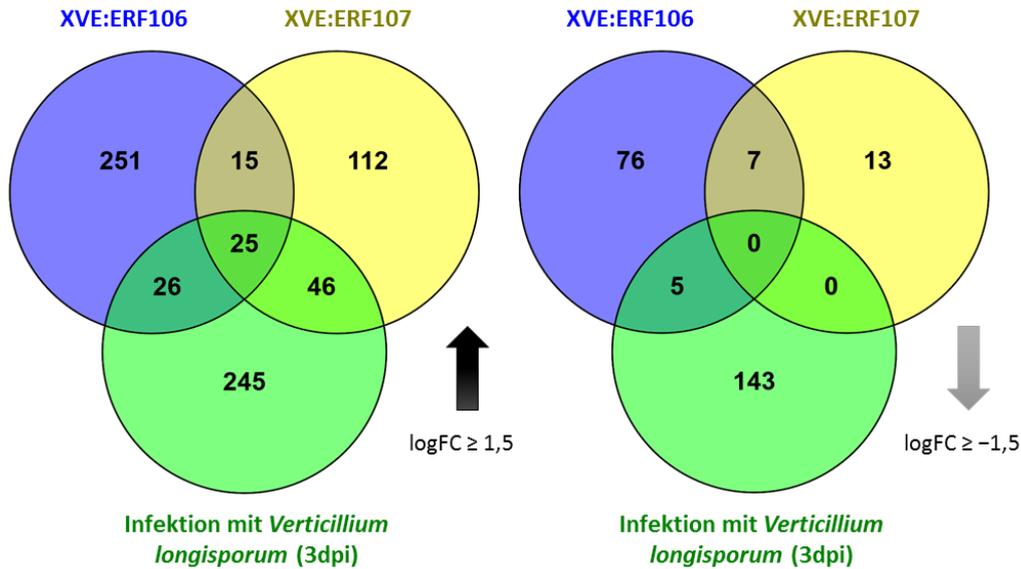


Abbildung 5.3 ERF106 und ERF107 aktivieren durch *Verticillium*-Infektion regulierte Gene. Das Venn-Diagramm zeigt die Übereinstimmungen der differentiell exprimierten Gene ($\log_2FC \geq 1,5$ mit $p \leq 0,01$) in den Funktionsgewinn-Mutanten XVE:ERF106 (blau) und XVE:ERF107 (gelb) sowie nach Infektion mit *Verticillium longisporum* (3dpi, $\log_2FC \geq 2,0$; grün) aus (Iven *et al.*, 2012). Links sind die aktivierten, rechts die inhibierten Gene dargestellt.

Erwartungsgemäß wird die Genexpression von *ERF106* und *ERF107* durch 9-HOT nicht beeinflusst (Abb. 4.16). Würde 9-HOT die Expression der TF aktivieren, so wäre auch bei Wildtyp-Pflanzen auf 9-HOT kein Wurzelphänotyp detektierbar, da vermehrte Expression von *ERF106* / *ERF107* das bessere Wachstum auf dem Oxylipin ermöglicht. Da durch die Überexpression von *ERF106* und *ERF107* viele Gene für die Stressabwehr angeschaltet werden, ist anzunehmen, dass diese Pflanzen auch resistenter gegenüber Pathogenbefall sind. Dies wurde bereits für den Pilz *Verticillium longisporum* gezeigt (Iven, 2009). Die entsprechenden Funktionsverlust-Mutanten zeigten nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* keine veränderte Anfälligkeit im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.17). Von den Funktionsgewinn-Mutanten ist aufgrund der Transkriptom-Analyse jedoch eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pseudomonas* oder anderen Pathogenen zu erwarten. Da Überexpression von *ERF106* und *ERF107* Gene für die Stressabwehr aktiviert, wurde auch kontrolliert, ob Pathogen-Infektion im Umkehrschluss die Expression der ERF-Gene aktiviert. Nach Infektion mit *Pseudomonas* konnte jedoch keine Veränderung der Genexpression von *ERF106* und *ERF107* detektiert werden (Abb. 4.17). Die Genexpression von *ERF106* und *ERF107* wird folglich durch andere Stimuli reguliert. In der Genexpressions-Datenbank Genevestigator wurde Hypoxia als Stimulus genannt (Abb.4.18). Dies konnte erfolgreich bestätigt werden (Abb. 4.19). Neben dem Wildtyp Col-0 wurde auch in den Funktionsverlust-Mutanten die Genexpression nach Überflutung untersucht. Interessanterweise zeigte sich dabei eine reziproke Regulation. In der Mutante *erf106* zeigte sich eine deutlich stärkere

Expression von *ERF107*, in der Mutante *erf107* dagegen für *ERF106*. Dieses Ergebnis deutet auf Redundanz der beiden TF oder auf eine gegenseitige Regulation hin. Denkbar wäre die gegenseitige Hemmung der Expression nach Überflutung, so dass im Wildtyp Col-0 beide Gene etwa gleich stark exprimiert werden. Fehlt ein TF, so entfällt die Inhibierung und es kommt zu einer stärkeren Transkription. Um dies zu bestätigen ist es im nächsten Schritt essentiell, zu erforschen ob *ERF106* und *ERF107* aktivierend oder inhibierend auf die Genexpression wirken. Die nahe Verwandtschaft spricht jedoch für die Redundanz der beiden TF. Dabei übernimmt ein TF in Abwesenheit des anderen auch dessen Funktion. Im Falle der Überflutung kann die Signalübertragung in den Funktionsverlust-Mutanten nur noch über einen TF weitergeleitet werden, welcher deshalb stärker transkribiert wird. Zur Überprüfung dieser Annahme ist es jedoch erforderlich zu wissen, durch welche Signale die Genexpression der beiden TF nach Überflutung aktiviert wird. Analysiert man die nächstverwandten TF *ERF104* und *ERF105*, so zeigt sich für diese Gene keine Veränderung der Expression nach Überflutung. Auch die Mutation von *ERF106* und/oder *ERF107* hat keinen Einfluss auf die Transkription von *ERF104* und *ERF105*. Die einzige Veränderung war nach Überexpression von *ERF107* in der Transkriptom-Analyse erkennbar: *ERF105* wurde mit \log_2FC 1,437 verstärkt exprimiert. Da der Promotor von *ERF105* laut AthaMap auch Bindestellen für ERF-TF enthält, ist es möglich, dass *ERF105* durch *ERF107* reguliert wird (Tabelle 8.18). Für weitere Erkenntnisse wäre die Analyse von *erf104*- und *erf105*-Mutanten sowie von Tripel- oder Quadrupel-Mutanten der vier ERF-TF ebenfalls aufschlussreich.

5.7 Die Genexpression von Hypoxia-Antwort-Genen wird durch Mutation der Transkriptionsfaktoren *ERF106* und *ERF107* nicht beeinträchtigt

Obwohl Überflutung die Transkription von *ERF106* und *ERF107* signifikant aktiviert, gibt es bislang keinerlei Hinweise darauf, dass Hypoxia-Antworten durch *ERF106* und/oder *ERF107* reguliert werden. Stattdessen sind es vor allem ERF-TF der Gruppe VII, die im Zusammenhang mit Überflutung erforscht sind (Hinz *et al*, 2010; Licausi *et al*, 2010; Gibbs *et al*, 2011; Licausi *et al*, 2011; Yang *et al*, 2011). Für die Sauerstoff-abhängige Regulation der Proteinstabilität dieser ERF-TF ist ein N-terminales Methionin-Cystein-Motiv entscheidend. Während bei den TF der ERF-Gruppe VII zusätzlich zum Met-Cys-Motiv die ersten 9 Aminosäuren konserviert sind, finden sich keine Sequenz-Homologien zu *ERF106* und *ERF107* (Abb. 5.4). Folglich ist die Rolle von *ERF106* / *ERF107* in der Hypoxia-Antwort unabhängig von ERF-Gruppe VII-TF.

ERF-Gruppe	At-Nr.	TF	N-Terminus											
IX	At5g07580	ERF106	M	T	P	S	L	K	P	L	R	E	R	Q
IX	At5g61590	ERF107	M	E	T	F	E	E	S	S	D	L	D	V
VII	At2g47520	HRE2	M	C	G	G	A	I	I	S	D	F	I	W
VII	At3g16770	Rap2.3	M	C	G	G	A	I	I	S	D	Y	A	P
VII	At1g72360	HRE1	M	C	G	G	A	V	I	S	D	Y	I	A
VII	At1g53910	Rap2.12	M	C	G	G	A	I	I	S	D	F	I	P
VII	At3g14230	Rap2.2	M	C	G	G	A	I	I	S	D	F	I	P

Abbildung 5.4 Der N-Terminus von ERF106 und ERF107 zeigt kein Met-Cys-Motiv. Dargestellt sind jeweils die ersten 12 Aminosäuren der N-Termini von ERF106 und ERF107 sowie den TF der ERF-Gruppe VII HRE2, Rap2.3, HRE1, Rap2.12 und Rap2.2. Die graue Markierung zeigt die Übereinstimmung.

Auch die durchgeführte Transkriptom-Analyse von Col-0 und den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* nach Überflutung zeigte keine gravierenden Änderungen von Hypoxia-Antworten nach Verlust der TF (Abb. 4.20, Tabelle 4.6). Einzig *HRA1* (HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR 1) wird in den Funktionsverlust-Mutanten nach Überflutung nicht mehr transkribiert. *HRA1* ist ein Tri-Helix-TF, dessen Genexpression durch Hypoxia induziert wird. Zudem interagiert *HRA1* mit dem ERF-TF *RAP2.12* und schränkt dessen Aktivität ein. Weiterhin dämpft *HRA1* die Induktion von Fermentations-Enzymen wie *ADH1* (ALKOHOLDEHYDROGENASE 1) und *PDC1* und wirkt somit der Leerung der Energiereserven durch Glykolyse entgegen (Giuntoli *et al.*, 2014). *HRA1* wird daher eine den Energie-Haushalt regulierende Funktion zugeschrieben, was im Fall von Überflutung extrem wichtig für das Überleben der Pflanze ist. Dass die Transkription von *HRA1* in den *erf*-Mutanten nicht nachweisbar ist, lässt vermuten, dass in diesen Pflanzen die Regulation des Energie-Haushalts bei Überflutung weniger kontrolliert ist. Eine mögliche Folge wäre eine höhere Anfälligkeit unter Hypoxia-Bedingungen und demnach eine geringere Überlebensrate. Die Untersuchung des Überlebens dieser Mutanten nach Überflutung bei ansonsten normalen Bedingungen (12h Licht / 12h Dunkel) zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Tendenz zeigt eine höhere Anfälligkeit gegenüber Hypoxia bei den Mutanten *erf107* und *erf106xerf107*. Da die Überlebensrate nach 10 Tagen auch beim Wildtyp Col-0 noch bei 80% lag, ist anzunehmen, dass die Überflutung ohne zusätzlich Dunkelheit für diese Mutanten nicht stringent genug war. Es ist jedoch auch möglich, dass die Veränderung von einem einzigen Hypoxia-Antwort-Gen nicht ausreicht, um bei den Mutanten einen Phänotyp hinsichtlich Überleben zu induzieren. Um dies aufzuklären ist ein Versuch mit verkürzter Zeit unter Hypoxia-Bedingungen, dafür in Dunkelheit sinnvoll. Auch die Untersuchung der ERF-Überexpressions-Pflanzen unter Hypoxia-Bedingungen ist für die Aufklärung der Regulationsmechanismen empfehlenswert. Die vermehrte Expression von *ERF106* bzw. *ERF107* führt jedoch nur zu schwachen Veränderungen der Hypoxia-Antwort-Gene. Die einzige Veränderung ist die verminderte Expression von *ADH1*, *PDC1* und *SUS4* in XVE:ERF106-Pflanzen. Ob diese Änderung ausreicht, um das Überleben von ERF106 und/oder ERF107 Funktionsgewinn-

Mutanten nach Überflutung zu modifizieren, ist noch nicht erforscht. Es fällt allerdings auf, dass durch Überexpression von *ERF106* die Genexpression inhibiert wird, während sie durch *ERF107* wie auch nach Hypoxia im Wildtyp aktiviert wird (Abb. 5.5). Von diesem Ergebnis ausgehend ist auch denkbar, dass sich die Funktionsgewinn-Mutanten der beiden TF hinsichtlich des Überlebens nach Überflutung unterscheiden.

	XVE ERF106	XVE ERF107	Col-0 Hypoxia
HUP09	-	-	↑ 7,65
HRE1	-	-	↑ 4,10
SUS4	↓ -1,6	↑ 1,4	↑ 4,02
HB1	-	↑ 2,1	↑ 3,81
PDC1	↓ -1,7	-	↑ 3,42
HRE2	-	↑ 1,9	↑ 2,86
ADH	↓ -1,5	↑ 1,6	↑ 2,86
SUS1	-	↑ 1,1	↑ 1,42

Abbildung 5.5 Funktionsgewinn bzw. Funktionsverlust von *ERF106* bzw. *ERF107* beeinflusst die Genexpression verschiedener Gene der Hypoxia-Antwort. Beschrieben sind HUP09, HRE1, SUS4, HB1, PDC1, HRE2, ADH und SUS1. Gezeigt sind nur die Werte (\log_2FC) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ aus den Transkriptom-Analysen nach vermehrter Expression von *ERF106* bzw. *ERF107* (XVE:ERF106, XVE:ERF107) und im Wildtyp Col-0 nach Überflutung (Hypoxia). Der Farbverlauf von grün (stark induziert) nach rot (stark gehemmt) sowie die Pfeile verdeutlichen die Expressionswerte.

Dass sich *ERF106* und *ERF107* hinsichtlich ihrer Funktion trotz der nahen Verwandtschaft unterscheiden, lässt auch der Blick auf bestimmte Marker-Gene für Immunantworten vermuten. Dabei wird deutlich, dass alle 17 hier untersuchten Gene, die in der Regulation von Stress-Antworten bekannt sind, durch *ERF107* verstärkt exprimiert werden. *ERF106* verändert nur bei 6 von 17 Genen die Stärke der Genexpression. Die von *ERF106* besonders stark aktivierten Gene *PDF1.2* und *PDF1.3* sind durch *ERF107* nur schwach oder gar nicht reguliert (Abb. 5.6).

Von Hsu *et al* konnte 2013 zudem ein Zusammenhang zwischen Überflutung und Immunabwehr in *Arabidopsis* gezeigt werden. So waren Wildtyp-Pflanzen, die nach Überflutung mit *Pseudomonas syringae* infiziert wurden, resistenter gegen das Bakterium. Verwendeten sie *wkry22*-Mutanten, so waren die Pflanzen trotz Überflutung anfälliger gegenüber *Pseudomonas*. Auch Marker-Gene für die Immunantwort wie die Flg22-induzierte Rezeptor-ähnliche Kinase *FRK1* und der TF *WRKY53* wurden in *wkry22* Mutanten weniger stark aktiviert (Hsu *et al*, 2013). Die Genexpression von *WRKY22* wird durch Überflutung angeregt. Die Signaltransduktion der Abwehr- und der Hypoxia-Antworten stehen daher in engem Zusammenhang. Ob auch andere TF, die durch Hypoxia aktiviert werden, die Immunabwehr stärken, ist bislang noch nicht bekannt. Zwischen *WRKY22* und *ERF106* / *ERF107* gibt es einige

Parallelen. Die Transkription der drei TF wird nach Überflutung aktiviert und durch ihre Überexpression werden Marker-Gene für Stressabwehr und Immunantwort vermehrt transkribiert.

	XVE 106	XVE 107
FKR1	-	↑ 5,1
WRKY29	-	↑ 1,1
GST1	↑ 2,3	↑ 2,9
PER62	-	↑ 2,8
PER4	-	↑ 2,8
CYP82C2	-	↑ 6,2
CYP81F2	↑ 4,5	↑ 3,2
FOX	↑ 2,9	↑ 5,8
CBP60g	-	↑ 1,9
GST6	-	↑ 0,5
WRKY53	-	↑ 1,4
WRKY22	-	↑ 0,9
WRKY30	-	↑ 6,0
PDF1.2	↑ 7,1	-
ADH1	↓ -1,5	↑ 1,6
ACS7	-	↑ 3,5
PDF1.3	↑ 8,6	↑ 3,0

Abbildung 5.6 Überexpression von *ERF106* bzw. *ERF107* beeinflusst die Genexpression verschiedener Immunantwort-Gene. Beschrieben sind FKR1, WRKY29, GST1, PER62, PER4, CYP82C2, CYP81F2, FOX, CBP60g, GST6, WRKY53, WRKY22, WRKY30, PDF1.2, ADH1, ACS7 und PDF1.3 (Asai *et al.*, 2002; Boudsocq *et al.*, 2010; Kovtun *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2013). Gezeigt sind nur die Werte (\log_2FC) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ aus der Transkriptom-Analyse nach vermehrter Expression von *ERF106* bzw. *ERF107* (XVE:ERF106, XVE:ERF107). Der Farbverlauf von grün (stark induziert) nach rot (stark gehemmt) sowie die Pfeile verdeutlichen die Expressionswerte.

Der TF *MYB15*, der bei Hypoxia nur in Anwesenheit von WRKY22 angeschaltet wird, wird auch durch Überexpression von *ERF106* und *ERF107* vermehrt transkribiert (Tabelle 8.5 und 8.6). Mutation der ERF-TF hat aber keinen Einfluss auf Hypoxia-induzierte Transkription von *MYB15*. Da der *MYB15*-Promotor laut AthaMap auch Bindestellen für ERF-TF aufweist, ist eine direkte Regulierung durch *ERF106* / *ERF107* nicht auszuschließen. Dass *ERF106* und *ERF107* ähnlich zu WRKY22 Immunantworten aktivieren, kann mit den Mutanten ermittelt werden. Die Pflanzen der Funktionsverlust-Mutanten müssten vor der Infektion mit *Pseudomonas* durch Überflutung gestresst werden, um gegebenenfalls die Immunantwort anzuregen. Diese Pflanzen haben nur Mutationen in *ERF106* und *ERF107*, besitzen aber noch ein funktionsfähiges *WRKY22*-Gen. Daher sollte die Vorbehandlung mit Hypoxia-Stress zu einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber dem Pathogen führen. Wird durch *ERF106* / *ERF107* ein ähnlicher, aber *WRKY22*-unabhängiger Weg zur Aktivierung der Immunantwort angeschaltet, so sollten die Funktionsverlust-Mutanten sich in der Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas* vom Wildtyp unterscheiden. Dann wäre zusätzlich die Untersuchung von *erf106xerf107xwrky22*-Mutanten

aufschlussreich. Da die durch Überflutung induzierte Expression von *ERF106* und *ERF107* in *wrky22*-Mutanten aber nicht verändert ist, ist eine WRKY22-unabhängige Regulation durch ERF106 / ERF107 wahrscheinlicher (Hsu *et al*, 2013).

Möglicherweise besteht auch eine Verbindung zwischen 9-HOT und Hypoxia-Antworten, z.B. über ROS. Es ist bekannt, dass ROS auch zur Bildung von Oxylipinen in Pflanzen beitragen (Feussner & Wasternack, 2002; Mueller & Berger, 2009). ROS werden unter anderem während und nach Überflutung gebildet (Santosa *et al*, 2007; Pucciariello *et al*, 2012). Demnach wäre anzunehmen, dass bei Hypoxia auch Oxylipine entstehen. Insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass Funktionsgewinn-Mutanten von ERF106 / ERF107 ein besseres Wurzelwachstum auf den Oxylipinen 9-HOT und 9-KOT zeigen, während die Genexpression dieser TF durch Hypoxia induziert wird. Oxylipin-Messungen in Col-0 und den Funktionsverlust-Mutanten vor und nach Hypoxia könnten diese These unterstützen.

5.8 Zusammenfassung und Ausblick

Die Untersuchung der AtTORF-Ex-Kollektion hat ergeben, dass verschiedene Transkriptionsfaktoren ein mit Wildtyp verglichen besseres Wurzelwachstum auf dem Oxylipin 9-HOT ermöglichen. Zu Beginn wurde erwartet, dass die TF an verschiedenen Stellen in die Signaltransduktion eingreifen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression der TF ERF106 und ERF107 einerseits die allgemeine Stressabwehr aktiviert wird und andererseits auch Entgiftungsmechanismen in der Pflanze angeschaltet werden (Abb. 5.7). Entgiftungswege werden auch durch TGA5 angeschaltet, dessen Überexpression ebenfalls ein besseres Wurzelwachstum auf 9-HOT ermöglicht. Durch ERF106 und ERF107 werden zudem Gene wichtig für die Eisen-Aufnahme reguliert, was möglicherweise einen Effekt auf LOX1 oder den ROS-Metabolismus hat. Der Funktionsverlust von bZIP11 führt ebenfalls zu besserem Wachstum auf 9-HOT und zeigt eine mögliche energie-abhängige Wachstumsregulation.

Um genauere Aussagen zu treffen, wären die Analyse der mRNA-Konzentration von LOX1 sowie die Oxylipin-Messung in *bzip11* und *lox1*-Funktionsverlustmutanten interessant. Dadurch könnte bestätigt werden, dass das Ausschalten von *bZIP11* auch die LOX1-Menge und damit die endogene Konzentration von 9-HOT reduziert. Ob eine geringere endogene Konzentration an 9-HOT und/oder anderen Oxylipinen ein besseres Wachstum auf exogenem 9-HOT ermöglicht, kann außerdem die Bestimmung von Oxylipin-Konzentrationen in ERF106- und ERF107-Funktionsgewinn-Mutanten zeigen.

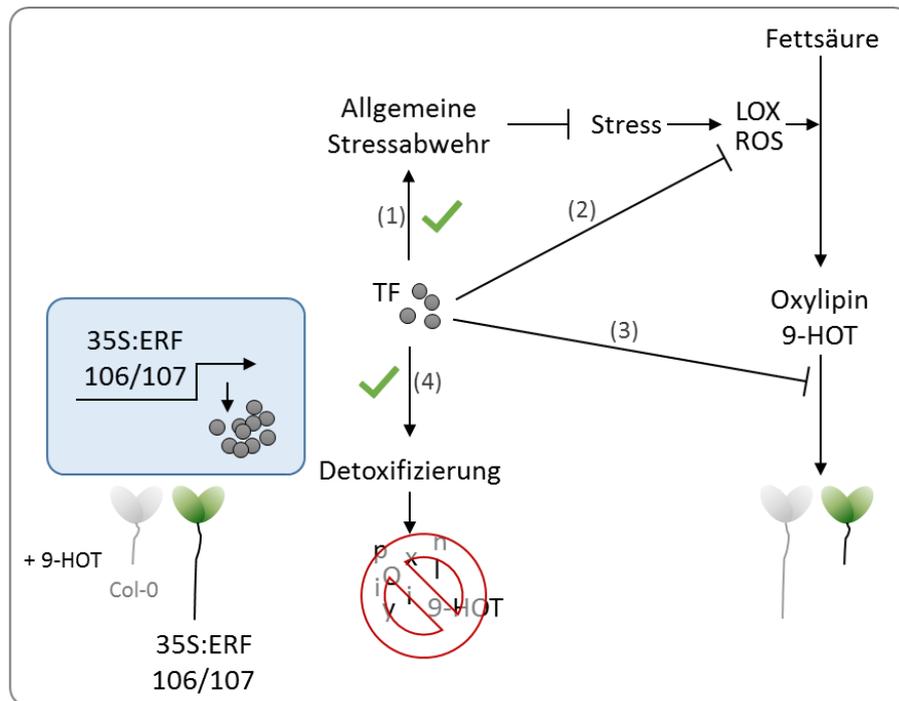


Abbildung 5.7 Modell zur Identifikation von TF, beteiligt an Oxylin-vermittelter Signaltransduktion. Die Überexpression von ERF106 und ERF107 (35S:ERF106/107) führt zu einem verbesserten Wachstum auf 9-HOT, verglichen mit wildtypischem Wachstum (Col-0 in grau). Das kann verschiedene Gründe haben. (1) Die TF aktivieren die generelle Toleranz gegenüber Stress. (2) Stress führt zur Umwandlung von Fettsäuren in Oxyline durch Enzyme wie Lipoxygenasen (LOX) oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS). TF reduzieren den Stress oder direkt die Biosynthese der C9-Oxyline. (3) TF greifen in die Oxylin-vermittelten Signalwege ein. (4) Durch die TF werden Proteine für die Detoxifizierung des Oxylins aktiviert. Die weiteren Untersuchungen von ERF106 und ERF107 haben ergeben, dass durch diese TF die allgemeine Stressabwehr (1) und die Detoxifizierung (4) aktiviert werden (grüne Häkchen). (Pfeile: aktivierend, Balken: hemmend, Kreise: TF-Proteine).

Zur Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen ROS und 9-HOT könnte die Bestimmung der ROS-Konzentration in den genannten Mutanten genutzt werden. So kann ermittelt werden, ob die Mutanten aufgrund geringerer ROS-Mengen den Stress durch zugesetzte Oxyline (9-HOT, 9-KOT) besser tolerieren können. Die Funktionsverlust-Mutante *erf106xerf107* zeigt sowohl auf 9-HOT hinsichtlich Wurzelwachstums als auch auf transkriptioneller Ebene kaum Änderungen im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Die zusätzliche Mutation der nächstverwandten TF ERF104 und ERF105 kann aufgrund von Redundanz nötig sein, um hier phänotypische Veränderungen erforschen zu können. Die Genexpression wichtiger Regulatoren des Eisen-Haushalts wie bHLH038, bHLH039, bHLH100, bHLH101, IRT1 und FRO2 ist in ERF106- und ERF107-Funktionsgewinn-Mutanten reduziert. Überprüfung der Eisen-Mengen in diesen Pflanzen kann zeigen, ob dadurch die Eisen-Aufnahme in diesen Pflanzen verändert ist. Ob die Eisen-Aufnahme Einfluss auf das Wurzelwachstum auf 9-HOT hat, kann die Untersuchung der *bhlh*-Tripelmutante (*bhlh039xbhlh100xbhlh101* bzw. *3xbhlh*) auf 9-HOT zeigen. Da Lipoxygenasen Eisen-haltige Enzyme sind, kann auch die LOX-Aktivität durch den

Eisengehalt in der Pflanze beeinflusst werden. Dies wiederum kann auch Einfluss auf das Wachstumsverhalten auf 9-HOT nehmen.

Die Verifizierung der Ziel-Gene von ERF106 und ERF107, die durch die Transkriptom-Analyse gefunden wurden, sind Untersuchungen mit Transformations-Analysen in Protoplasten und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) notwendig. Somit könnte die direkte Regulation durch die ERF-TF gezeigt werden. In diesem Zusammenhang kann auch erforscht werden, ob ERF106 und ERF107 einen aktivierenden oder reprimierenden Einfluss auf die Genexpression haben. Die Genexpression von ERF106 und ERF107 wird durch Überflutung aktiviert. Ob Funktionsgewinn- und/oder Funktionsverlust von ERF106 und ERF107 auch einen Einfluss auf das Überleben nach Überflutung hat, sollte in Hypoxia-Experimenten unter zusätzlich Dunkelheit untersucht werden. Wenn durch ERF106 / ERF107 ähnlich zu WRKY22 ein Weg zur Aktivierung der Immunantwort angeschaltet wird, so sollte die Vorbehandlung mit Überflutung die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen wie *Pseudomonas* verändern. Die Untersuchung von *erf106xerf107xwrky22*-Mutanten wäre in diesem Zusammenhang aufschlussreich. Ob auch eine Verknüpfung zwischen Hypoxia, ROS und Oxylipin-Konzentration besteht, kann durch Oxylipin-Messungen in Col-0 und den Funktionsverlust-Mutanten von ERF106 und ERF107 vor und nach Hypoxia überprüft werden.

6 Zusammenfassung

Oxylipine werden in der Pflanze unter Stressbedingungen gebildet. Die dafür notwendige Oxidation von Fettsäuren wird entweder nicht-enzymatisch über Radikale wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder enzymatisch über Lipoxygenasen katalysiert. Abhängig von der Position der Oxidation in der Fettsäure entstehen dabei C₁₃- oder C₉-Oxylipine. Sehr gut erforscht sind C₁₃-Oxylipine wie Jasmonsäure (JA), die bei biotischem Stress und Verwundung gebildet werden und bei exogener Gabe das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* hemmen. Die C₉-Oxylipine wie 9-Hydroxyoktadekatriensäure (9-HOT) sind erst wenig erforscht. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren, mit dem Fokus auf 9-HOT-vermittelte Signalwegen in *Arabidopsis thaliana*. Da bekannt ist, dass auch sie zu einer Hemmung des Wurzelwachstums führen, wurde dazu die Untersuchung des Wurzelwachstums von 10 Tage alten Keimlingen etabliert. Funktionsgewinn-Mutanten des Transkriptionsfaktors TGA5 sowie des TGA5-Zielgens *CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASE CYP81D11* zeigten auf 9-HOT ein verglichen mit Col-0 deutlich besseres Wurzelwachstum. Die AtTORF-Ex-Kollektion, eine große Sammlung an Überexpressions-Linien verschiedener Transkriptionsfaktoren, wurde hinsichtlich Wurzelwachstums auf dem Oxylipin 9-HOT analysiert. Die Gesamtheit der untersuchten Pflanzen enthielt 263 unabhängige TF-Expressions-Konstrukte. Von 6087 untersuchten Pflanzen zeigten 201 Pflanzen keine Hemmung des Wurzelwachstums auf 9-HOT. Dabei konnten 80 verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, deren Überexpression die Wurzelwachstums-hemmende Wirkung von 9-HOT kompensiert. Es zeigte sich eine Häufung von Transkriptionsfaktoren der ERF- (*ethylene responsive factor*) Familie. Die verstärkte Expression der nahe verwandten Transkriptionsfaktoren ERF106 und ERF107 ermöglichte sowohl auf 9-HOT als auch auf 9-KOT ein längeres Wurzelwachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die Genexpression von ERF106 und ERF107 wird durch Überflutung aktiviert. Durch Überflutung wird im Wildtyp die Expression von Hypoxia-Antwort-Genen wie *HRE1*, *SUS4* oder *PDC1* induziert. In den Funktionsverlust-Mutanten sind diese Gene in der Expression aber nicht beeinflusst. Auch ist nach Überflutung im normalen Tag / Nacht-Rhythmus kein signifikanter Unterschied im Überleben zwischen Col-0 und den Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* nachweisbar. Zur Identifikation möglicher Ziel-Gene von ERF106 und ERF107 wurden Transkriptom-Analysen durchgeführt. Die Funktionsverlust-Mutanten *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107* zeigten weder im Grundzustand noch nach 4 Stunden Überflutung Veränderungen in den bekannten Hypoxia-Antwort-Genen. Die Funktionsgewinn-Mutanten von ERF106 und ERF107 zeigten in der Transkriptom-Analyse eine deutliche Aktivierung von Genen, die wichtig für Entgiftung und Stressabwehr sind. Ebenso wurden wichtige Biosynthese-Gene aus der Camalexin- und Glukosinolat-Synthese in den Funktionsgewinn-Mutanten verstärkt exprimiert. Des Weiteren konnte eine verringerte Expression von Genen beobachtet werden, die wichtig für die Regulation der Eisen-Aufnahme sind, darunter

bHLH-Transkriptionsfaktoren, der Eisen-Transporter *IRON REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1)* und die Eisen-Reduktase *FERRIC REDUCTION OXIDASE 2 (FRO2)*. Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit durch die Untersuchung der *AtTORF-Ex*-Kollektion mehrere TF identifiziert, die wichtige Abwehr-Gene gegen Stress- und Vergiftung sowie bedeutende Gene im Bereich der Biosynthese und Eisenaufnahme regulieren können, um so die Antwort auf C₉-Oxylipine zu beeinflussen.

7 Summary

Oxylipins are built under stress conditions. They are the results of fatty acids oxidation that occurs either non-enzymatically by the action of free radicals like reactive oxygen species (ROS) or enzymatically by lipoxygenases conversion. There are two kinds of oxylipins, C₁₃- or C₉-, according to the position of the oxidation on the fatty acid back bone. Whereas C₁₃-oxlipins like jasmonic acid (JA) are well characterized, little is known about C₉-oxylipins like 9-hydroxyoctadecatrienoic acid (9-HOT). Both of them are generated as consequence of biotic stress or wounding and a common phenotypical mark is their ability to inhibit root growth of *Arabidopsis* seedlings. Preliminary studies have demonstrated that overexpression of the transcription factor TGA5 or its target gene *CYTOCHROM P450 MONOOXYGENASE CYP81D11* make the plants more resistant than wildtype Col-0 to oxylipin-driven root inhibition. The aim of the work presented in this thesis was to identify and characterize transcription factors involved in 9-HOT induced signaling. At the beginning, a screening aiming at the identification of transcription factors involved in the 9-HOT signaling was set up. The root growth of 10 day old seedlings from the *AtTORF-Ex*-collection grown on 9-HOT containing medium was analyzed. All analyzed plants harbor 263 independent TF expression constructs. Of 6087 analyzed plants 201 plants showed no inhibition of root growth on 9-HOT. Plant overexpressing 80 different transcription factors showed a long root-phenotype on 9-HOT containing medium, indicating that in this plants the 9-HOT activated signaling was impaired. Among them, ERF-transcription factor family was overrepresented. Overexpression of the closely related ERF106 and ERF107 enabled longer root growth compared to wild-type on 9-HOT as well as on 9-KOT. Analysis of the stimuli inducing the alteration of the expression of ERF106 and ERF107, identified submergence as one of the main one. Under hypoxic conditions in wildtype, the expression of hypoxia-response-genes like *HRE1*, *SUS4* or *PDC1* is induced. Expression levels of these genes are not affected in *erf106*, *erf107* and *erf106xerf107* loss-of-function mutants. Examination of the survival rate after submergence did not reveal significant differences between Col-0 and the loss-of-function-mutants *erf106*, *erf107* und *erf106xerf107*, at least under normal day-night-rhythm. To identify target genes of ERF106 and ERF107, transcriptome analysis were performed. The loss-of-function-mutants *erf106*, *erf107* and of their double mutant did not show any differences in the known hypoxia responses, neither in control nor 4 hours after

submergence. The gain-of-function-mutants of ERF106 and ERF107 exhibit a distinct gene activation of genes important for detoxification and stress regulation and defense. Moreover, genes for camalexin and glucosinolate biosynthesis pathway were up-regulated in these gain-of-function mutants. Genes crucial for regulation of iron uptake like *bHLH* transcription factors, iron transporter *IRON REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1)* and iron reductase *FERRIC REDUCTION OXIDASE 2 (FRO2)*, whereas, show a reduced expression in these mutants. The analysis of the AtTORF-Ex-collection revealed some interesting TFs that can regulate genes important for stress response and detoxification, and thereby influence the response to C₉-oxylipins.

8 Anhang

Tabelle 8.1 Kandidaten aus der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion hinsichtlich verbessertem Wurzelwachstum auf 9-HOT. Sortiert nach TF-Familie und Verwandtschaft. Ebenso ist die Häufigkeit aufgeführt, mit der der TF in der Durchmusterung der AtTORF-Ex-Kollektion gefunden wurde. Informationen aus der Arabidopsis-Datenbank tair (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>)

AT-NUMMER	HÄUFIGKEIT SCREEN	TF-FAMILIE	BEZEICHNUNG
AT2G16210	1x	B3 family	
AT4G25400	2x	bHLH, Gruppe Ib	bHLH118
AT2G42300	2x	bHLH, Gruppe XII	bHLH048
AT5G62610	1x	bHLH, Gruppe XII	bHLH079
AT3G06590	2x	bHLH	
AT5G15160	2x	bHLH	BNQ2
AT1G09250	1x	bHLH	
AT3G17100	1x	bHLH	
AT4G34590	4x	bZIP, Gruppe S	bZIP 11, ATB2
AT2G18160	3x	bZIP, Gruppe S	bZIP2, GBF5
AT1G68880	3x	bZIP, Gruppe S	bZIP8
AT5G49450	2x	bZIP, Gruppe S	bZIP1
AT5G60830	2x	bZIP, Gruppe S	bZIP70
AT1G59530	1x	bZIP, Gruppe S	bZIP4
AT2G04038	1x	bZIP, Gruppe S	bZIP48
AT3G30530	1x	bZIP, Gruppe S	bZIP42
AT3G49760	1x	bZIP, Gruppe S	bZIP5
AT5G24800	2x	bZIP, Gruppe C	bZIP9
AT5G28770	1x	bZIP, Gruppe C	bZIP63
AT4G36730	3x	bZIP, Gruppe G	bZIP41, GBF1
AT2G35530	2x	bZIP, Gruppe G	bZIP16
AT5G44080	2x	bZIP, Gruppe A	bZIP13
AT4G34000	2x	bZIP, Gruppe A	ABF3
AT2G36270	1x	bZIP, Gruppe A	ABI5
AT1G06070	2x	bZIP Gruppe I	bZIP69
AT1G43700	1x	bZIP, Gruppe I	VIP1
AT2G40620	1x	bZIP, Gruppe I	bZIP18
AT1G42990	2x	bZIP	bZIP60
AT5G06950	1x	bZIP, Gruppe D	bZIP20, TGA2
AT5G06960	1x	bZIP, Gruppe D	bZIP26, TGA5
AT1G22070	1x	bZIP, Gruppe D	bZIP22, TGA3
AT1G77920	1x	bZIP, Gruppe D	bZIP50, TGA7
AT1G08320	1x	bZIP Gruppe D	bZIP21, TGA9
AT4G28140	1x	ERF, Gruppe I	AtERF#054
AT5G65130	1x	ERF, Gruppe I	AtERF#057
AT4G06746	1x	ERF, Gruppe II	RAP2.9, AtERF#007
AT2G23340	2x	ERF, Gruppe II	DEAR3, AtERF#008
AT4G36900	2x	ERF, Gruppe II	Rap2.10, AtERF#009
AT1G77640	1x	ERF, Gruppe II	AtERF#013
AT1G22810	1x	ERF, Gruppe II	AtERF#019
AT1G01250	2x	ERF, Gruppe III	AtERF#023
AT3G60490	1x	ERF, Gruppe III	AtERF#035
AT4G32800	1x	ERF, Gruppe III	AtERF#043
AT5G53290	2x	ERF, Gruppe VI	CRF3, AtERF#065
AT4G27950	2x	ERF, Gruppe VI	CRF4, AtERF#066
AT1G22985	1x	ERF, Gruppe VI	CRF7, AtERF#069
AT3G16770	1x	ERF, Gruppe VII	Rap2.3, AtERF#072
AT1G72360	1x	ERF, Gruppe VII	AtERF#073

AT-NUMMER	HÄUFIGKEIT SCREEN	TF-FAMILIE	BEZEICHNUNG
AT1G06160	1x	ERF, Gruppe IX	ORA59, AtERF#094
AT5G43410	2x	ERF, Gruppe IX	AtERF#096
AT1G04370	1x	ERF, Gruppe IX	ERF14, AtERF#097
AT3G23230	1x	ERF, Gruppe IX	TDR1, AtERF#098
AT4G17500	1x	ERF, Gruppe IX	ERF1, AtERF#100
AT5G47220	1x	ERF, Gruppe IX	ERF2, AtERF#101
AT5G61600	1x	ERF, Gruppe IX	AtERF#104
AT5G51190	1x	ERF, Gruppe IX	AtERF#105
AT5G07580	5x	ERF, Gruppe IX	AtERF#106
AT5G61590	5x	ERF, Gruppe IX	AtERF#107
AT5G13910	2x	ERF, Gruppe X	LEP, AtERF#085
AT1G12980	2x	ERF, Gruppe X	ESR1, AtERF#089
AT1G12890	1x	ERF, Gruppe X	AtERF#088
AT4G34410	1x	ERF, Gruppe X	RRTF1, AtERF#109
AT1G28160	1x	ERF, Gruppe X	AtERF#087
AT1G28370	1x	ERF, Gruppe X	ERF11, AtERF#076
AT1G53170	1x	ERF, Gruppe X	ERF8, AtERF#079
AT3G20310	1x	ERF, Gruppe X	ERF7, AtERF#083
AT4G13040	2x	ERF	Integrase type, AtERF#
AT5G04760	1x	Homeodomain-like	
AT5G08520	1x	Homeodomain-like	
AT5G52660	1x	Homeodomain-like	
AT4G39250	2x	Hsf	RL1
AT3G22830	1x	Hsf	HSFA6B
AT1G31630	5x	MADSbox	AGL86
AT1G48150	3x	MADSbox	
AT1G22640	1x	MYB	MYB3
AT1G70000	1x	MYBlike	
AT1G19040	2x	NAC	
AT5G50820	2x	NAC	Nac097
AT1G02210	1x	NAC	
AT5G18300	1x	NAC	Nac088
AT1G56280	1x	Zn-Finger C2H2 TF	DI19

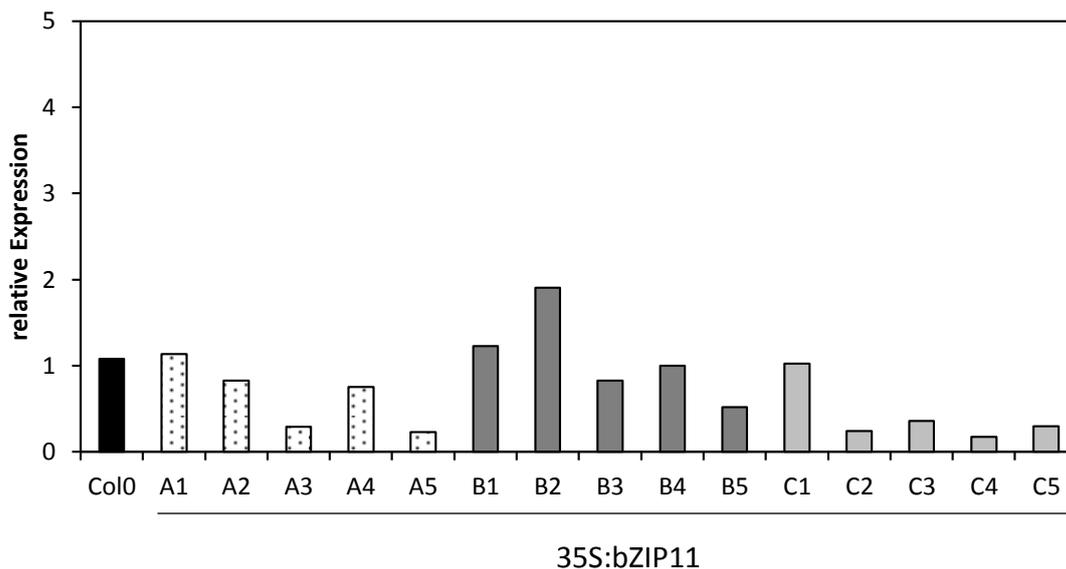


Abbildung 8.1 Relative Expression von bZIP11 in Col-0 und den At-TORF-Ex 35S:bZIP11 Pflanzen der unabhängigen Linien A, B und C. Es wurden jeweils fünf Pflanzen (A1, A2, usw.) untersucht. Die relative Genexpression wurde von zwei Wochen alten Keimlingen mittels qRT-PCR analysiert (MW+STABW aus einem Duplikat, n=2).

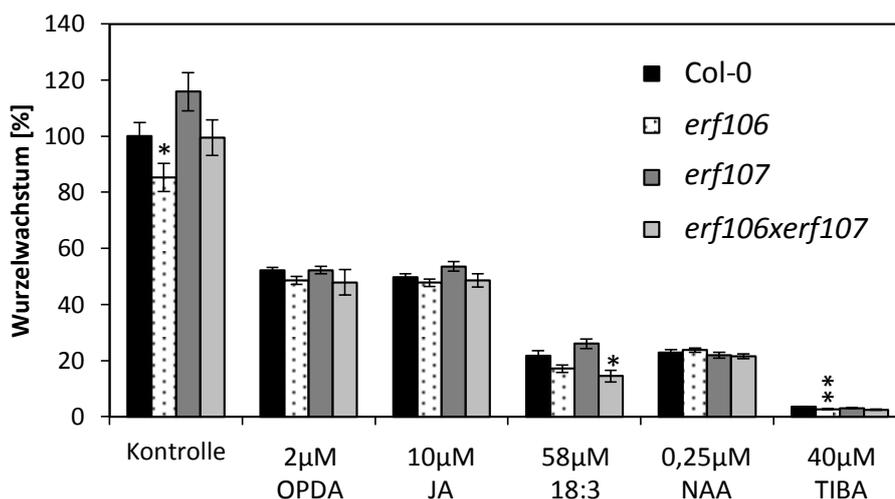


Abbildung 8.2 Wurzelwachstum von Col-0 und den Mutanten *erf106KO*, *erf107KO* und *erf106xerf107KO* auf verschiedenen Xenobiotika. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf Kontrolle (1xMS), 2µM OPDA, 10µM JA, 58µM Linolensäure 18:3, 0,25µM NAA und 40µM TIBA analysiert. Das Wachstum von Col-0 auf der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die statistische Analyse vergleicht die Mutanten mit der Kontrolle Col-0 unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, n≥19, *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001, t-Test unabhängiger Stichproben).

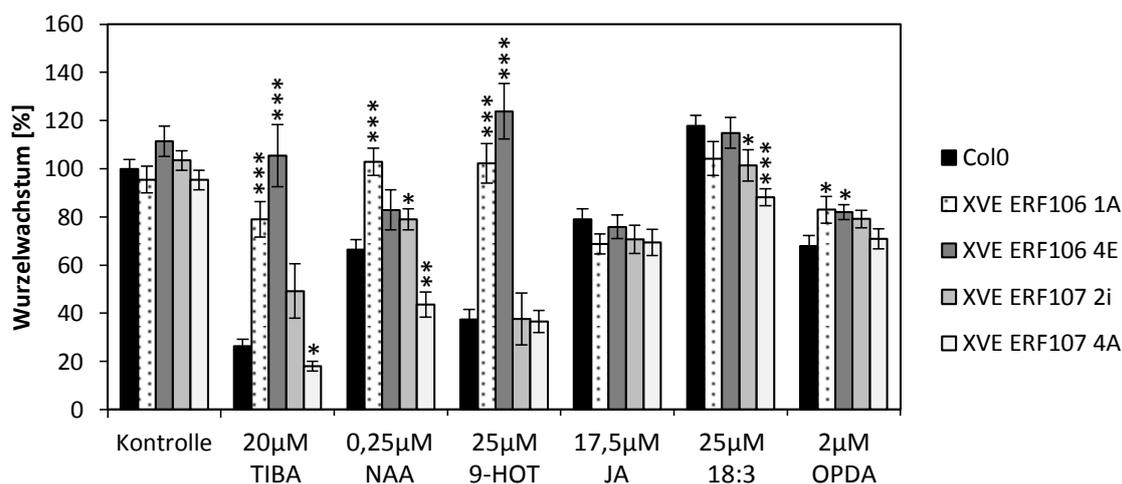


Abbildung 8.3 Wurzelwachstum von Col-0, XVE:ERF107-2i und XVE-ERF107-4A auf verschiedenen Xenobiotika. Die Wurzellänge wurde nach 5 Tagen Wachstum auf Kontrolle (1xMS), 20µM TIBA, 0,25µM NAA, 25µM 9-HOT, 17,5µM JA, 25µM Linolensäure 18:3 und 2µM OPDA analysiert. Zusätzlich zu den Oxylipinen wurde 10µM β -Estradiol zugegeben. Das Wachstum von Col-0 auf der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die statistische Analyse vergleicht die XVE-Linien mit der Kontrolle Col-0 unter den jeweiligen Bedingungen (MW+SE, $n \geq 19$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t-Test unabhängiger Stichproben).

Tabelle 8.2 Auflistung der in der Mutante *erf106* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,5$ differentiell exprimierten Gene ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106 VS. COL-0
AT3G27040	3,576	3,87E-04		
AT2G34880	3,273	5,61E-05	MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 27 (MEE27)	
AT3G60120	2,484	1,44E-03	BETA GLUCOSIDASE 27 (BGLU27), PEN2-Homolog	
AT3G29644	2,268	1,84E-03		
AT5G10100	2,249	1,06E-04	TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE I (TPPI)	
AT4G39235	2,180	8,92E-09		
AT3G43850	2,165	4,21E-07		
AT2G31730	2,031	4,29E-03		
AT1G50040	1,987	9,98E-09		
AT1G35140	1,957	1,34E-08	PHOSPHATE-INDUCED 1 (PHI-1)	
AT1G04555	1,819	2,17E-03		
AT2G34600	1,759	2,52E-05	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7 (JAZ7)	
AT1G32010	1,748	1,44E-04		
AT1G21910	1,681	1,68E-05	DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN 26 (DREB26)	
AT4G08950	1,627	1,13E-05	EXORDIUM (EXO)	
AT3G19680	1,554	7,60E-13		
AT4G13340	1,553	5,78E-06	LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 3 (LRX3)	
AT2G47770	-1,615	2,17E-03	TSPO(OUTER MEMBRANE TRYPTOPHAN-RICH SENSORY PROTEIN)-RELATED	
AT5G07580	-3,137	2,84E-42	ERF106	

Tabelle 8.3 Auflistung der in der Mutante *erf107* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,5$ differentiell exprimierten Gene ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF107 VS. COL-0
AT2G26150	2,840	3,85E-07	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A2 (HSFA2)	
AT1G59860	2,790	1,52E-05		
AT3G29644	2,478	3,14E-04		
AT3G51910	2,297	5,45E-10	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A7A (HSFA7A)	
AT1G60110	2,291	2,20E-03		
AT2G31730	2,273	3,53E-04		
AT2G01010	2,112	6,10E-03		
AT3G41768	2,105	5,69E-03		
AT4G15680	1,799	8,66E-05		
AT2G01020	1,770	8,43E-03		
AT1G21910	1,720	1,33E-05	DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN 26 (DREB26)	
AT4G15700	1,558	1,85E-03		
AT5G11330	-2,203	4,78E-31		
AT2G27180	-5,643	3,84E-03		
AT5G61590	-5,667	1,44E-97	ERF107	
AT2G42220	-5,761	1,05E-205		

Tabelle 8.4 Auflistung der in der Mutante *erf106xerf107* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,5$ differentiell exprimierten Gene ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106XERF107 VS. COL-0
AT1G13609	4,607	1,07E-36		
AT2G41240	3,332	4,16E-18	BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 100 (BHLH100)	
AT4G14548	3,330	2,41E-10		
AT1G47400	3,052	3,66E-11		
AT4G11880	3,017	2,26E-03	AGAMOUS-LIKE 14 (AGL14)	
AT2G30766	3,012	1,39E-14		
AT2G30760	2,917	1,99E-14		
AT3G56980	2,591	1,52E-11	(BHLH039)	
AT3G56970	2,568	9,94E-11	(BHLH038)	
AT1G47395	2,447	1,25E-09		
AT2G20362	2,402	4,46E-03		
AT2G14247	2,360	1,95E-04		
AT5G57980	2,268	4,66E-03	RNA POLYMERASE II FIFTH LARGEST SUBUNIT, C (RPB5C)	
AT3G29644	2,261	4,10E-04		
AT1G49860	2,221	3,84E-06	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (CLASS PHI) 14 (GSTF14)	
AT3G04320	2,026	4,69E-03		
AT2G30750	1,959	7,16E-03	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 12 (CYP71A12)	
AT3G25940	1,948	1,46E-03		
AT2G24700	1,876	6,82E-03		
AT3G60660	1,865	1,77E-03		
AT2G31730	1,826	5,95E-03		
AT1G63100	1,782	2,45E-08		
AT1G34770	1,723	2,87E-03		
AT3G19430	1,702	9,17E-04		
AT5G01870	1,692	3,23E-07		
AT5G66960	1,638	2,25E-03		
AT1G04425	1,634	1,87E-03		

AT-NUMMER	LOG₂FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106XERF107 VS. COL-0
AT5G33300	1,615	1,29E-03		
AT3G19050	1,513	2,13E-04	PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 2 (POK2)	
AT4G31870	-1,509	9,57E-05	GLUTATHIONE PEROXIDASE 7 (GPX7)	
AT1G11175	-1,510	1,79E-05		
AT5G53870	-1,514	6,16E-04	EARLY NODULIN-LIKE PROTEIN 1 (ENODL1)	
AT4G36500	-1,518	7,57E-07		
AT5G63450	-1,520	2,58E-11	CYTOCHROME P450, FAMILY 94, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 1 (CYP94B1)	
AT5G42580	-1,525	1,44E-09	CYTOCHROME P450, FAMILY 705, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 12	
AT4G27410	-1,549	7,25E-17	RESPONSIVE TO DESICCATION 26 (RD26)	
AT2G26530	-1,552	7,87E-09	(AR781)	
AT5G52310	-1,556	9,94E-11	LOW-TEMPERATURE-INDUCED 78 (LTI78)	
AT5G25240	-1,561	5,80E-03		
AT5G26270	-1,563	1,13E-08		
AT1G63350	-1,567	6,35E-03		
AT5G20230	-1,574	9,56E-11	BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN (BCB)	
AT4G38932	-1,589	1,65E-07		
AT5G20410	-1,590	2,09E-03	MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE 2 (MGD2)	
AT3G48020	-1,592	4,09E-05		
AT1G05100	-1,593	3,10E-03	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 18 (MAPKKK18)	
AT3G15500	-1,596	3,63E-04	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3 (NAC3)	
AT3G03480	-1,619	9,09E-03	ACETYL COA:(Z)-3-HEXEN-1-OL ACETYLTRANSFERASE (CHAT)	
AT1G33590	-1,675	1,97E-16		
AT5G52320	-1,677	4,09E-05	CYTOCHROME P450, FAMILY 96, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 4 (CYP96A4)	
AT1G73120	-1,690	9,67E-07		
AT5G04340	-1,701	3,47E-13	ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6 (ZAT6)	
AT1G55450	-1,724	1,25E-14		
AT1G80160	-1,761	1,79E-05	GLYOXYLASE I 7 (GLYI7)	
AT1G21130	-1,770	2,37E-24	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 4 (IGMT4)	
AT2G05540	-1,778	4,01E-08		
AT2G24600	-1,783	1,31E-04		
AT1G16850	-1,786	1,14E-06		
AT3G17520	-1,814	6,45E-04		
AT3G02040	-1,820	4,59E-03	SENESCENCE-RELATED GENE 3 (SRG3)	
AT1G52690	-1,822	7,48E-04	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 7 (LEA7)	
AT3G48240	-1,830	1,81E-03		
AT4G37990	-1,840	1,70E-04	ELICITOR-ACTIVATED GENE 3-2 (ELI3-2)	
AT4G22710	-1,849	2,32E-17	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 2 (CYP706A2)	
AT1G23140	-1,858	1,03E-04		
AT1G05675	-1,862	3,50E-04		
AT4G18197	-1,863	3,02E-07	PURINE PERMEASE 7 (PUP7)	
AT3G05630	-1,869	7,43E-04	PHOSPHOLIPASE D P2 (PLDP2)	
AT5G03210	-1,875	3,14E-04	DBP-INTERACTING PROTEIN 2 (DIP2)	
AT1G66090	-1,902	1,46E-03		
AT1G61800	-1,903	3,18E-06	GLUCOSE-6-PHOSPHATE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR 2 (GPT2)	
AT5G14180	-1,906	7,68E-04	MYZUS PERSICAE-INDUCED LIPASE 1 (MPL1)	
AT5G63350	-1,906	1,90E-03		
AT4G22690	-1,921	2,07E-21	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1 (CYP706A1)	
AT3G04210	-1,928	1,25E-14		
AT4G11890	-1,948	5,64E-03	ABA-AND OSMOTIC-STRESS-INDUCIBLE RECEPTOR-LIKE CYTOSOLIC KINASE1	
AT5G06760	-1,959	9,48E-05	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4-5 (LEA4-5)	
AT2G04040	-1,993	1,30E-15	DETOXIFICATION 1 (DTX1)	

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106XERF107 VS. COL-0
AT1G69890	-2,014	2,41E-11		
AT1G01480	-2,026	6,98E-06	1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 2 (ACS2)	
AT3G43850	-2,034	6,75E-04		
AT5G39520	-2,087	2,65E-04		
AT1G08310	-2,093	2,26E-03		
AT5G26920	-2,094	1,11E-15	CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G (CBP60G)	
AT1G52890	-2,095	1,50E-08	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 19 (NAC019)	
AT1G19200	-2,098	3,65E-03		
AT5G52300	-2,107	1,27E-04	LOW-TEMPERATURE-INDUCED 65 (LTI65)	
AT5G59220	-2,107	1,41E-23	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1 (HA11)	
AT4G39580	-2,118	4,84E-03		
AT3G55500	-2,143	5,09E-04	EXPANSIN A16 (EXPA16)	
AT1G66570	-2,264	1,15E-05	SUCROSE-PROTON SYMPORTER 7 (SUC7)	
AT5G54165	-2,295	1,91E-03		
AT5G20790	-2,357	7,32E-05		
AT2G36770	-2,417	5,19E-10		
AT2G25735	-2,481	4,44E-03		
AT4G18205	-2,560	2,43E-17		
AT5G05220	-2,618	2,38E-03		
AT1G79680	-2,700	1,87E-03	WALL ASSOCIATED KINASE (WAK)-LIKE 10 (WAKL10)	
AT2G45570	-2,762	9,06E-29	CYTOCHROME P450, FAMILY 76, SUBFAMILY C, POLYPEPTIDE 2 (CYP76C2)	
AT2G47770	-2,891	4,32E-11	TSPO(OUTER MEMBRANE TRYPTOPHAN-RICH SENSORY PROTEIN)-RELATED	
AT3G16530	-2,920	1,24E-25		
AT1G25275	-2,927	2,46E-34		
AT4G29050	-3,128	3,02E-07		
AT4G00970	-3,362	2,22E-09	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 41 (CRK41)	
AT4G24890	-3,452	6,31E-03	PURPLE ACID PHOSPHATASE 24 (PAP24)	
AT3G09922	-3,560	4,16E-03	INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION1 (IPS1)	
AT5G07580	-3,657	1,86E-48	ERF106	
AT3G59930	-3,787	4,91E-08		
AT3G25240	-3,943	1,41E-05		
AT5G20260	-3,961	5,58E-04		
AT2G42220	-5,303	1,54E-193		
AT5G61590	-7,624	2,62E-114	ERF107	

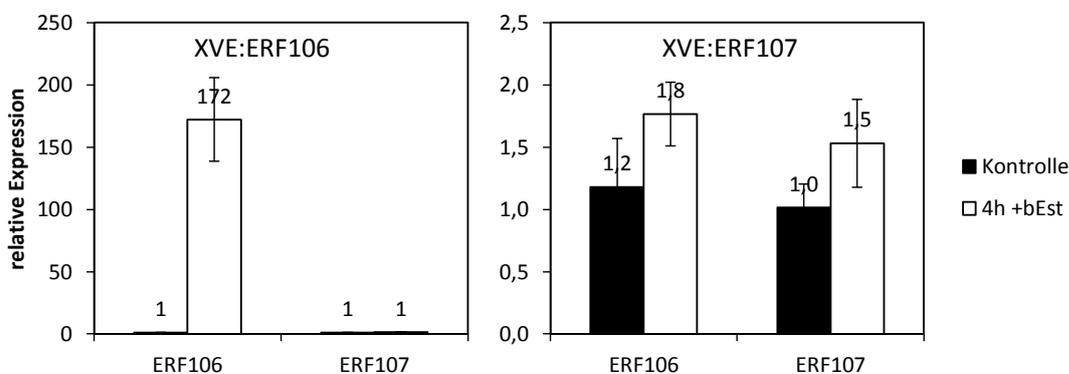


Abbildung 8.4 Kontrolle der XVE:ERF106 bzw. XVE:ERF107 Transkriptom-Analyse. Gezeigt ist die relative Expression von ERF106 und ERF107 in den Linien XVE:ERF106 und XVE:ERF107 in den Proben die auch für die Transkriptom-Analyse verwendet wurden. Verglichen wird die Kontrolle (unbehandelt) mit den für 4h β -Estradiol-behandelten Proben. (MW+STABW, n=4).

Tabelle 8.5 Auflistung der differentiell exprimierten Genen in den Funktionsgewinn-Mutanten XVE:ERF106 nach β -Estradiol-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,5$ ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT2G26010	8,623	2,20E-15	PLANT DEFENSIN 1.3 (PDF1.3)	
AT1G24580	7,638	2,56E-08		
AT1G15540	7,281	5,66E-08		
AT4G33720	7,179	2,15E-07		
AT5G44420	7,107	5,60E-10	PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2)	
AT3G49620	6,995	4,80E-51	DARK INDUCIBLE 11 (DIN11)	
AT2G14610	6,942	3,49E-03	PATHOGENESIS-RELATED GENE 1 (PR1)	
AT1G52270	6,670	1,72E-99		
AT5G07580	6,510	0,00E+00	ERF106	
AT1G79180	6,053	1,46E-04	MYB DOMAIN PROTEIN 63 (MYB63)	
AT5G61160	5,984	7,07E-88	ANTHOCYANIN 5-AROMATIC ACYLTRANSFERASE 1 (AACT1)	
AT1G33760	5,970	2,68E-04		
AT3G44830	5,961	2,58E-04		
AT5G52670	5,948	7,54E-03		
AT5G44430	5,869	4,03E-04	PLANT DEFENSIN 1.2C (PDF1.2c)	
AT1G69325	5,865	5,40E-04		
AT2G39855	5,775	1,22E-03		
AT2G26020	5,715	1,18E-03	PLANT DEFENSIN 1.2B (PDF1.2b)	
AT3G23550	5,593	5,93E-107		
AT4G27660	5,542	3,23E-03		
AT5G13900	5,467	9,78E-03		
AT1G26700	5,344	8,19E-03	MILDEW RESISTANCE LOCUS O 14 (MLO14)	
AT3G15356	5,048	2,95E-152		
AT4G06746	4,969	2,70E-89	RELATED TO AP2 9 (RAP2,9)	
AT1G67980	4,792	7,41E-08	CAFFEYOYL-COA 3-O-METHYLTRANSFERASE (CCOAMT)	
AT3G07273	4,784	1,13E-08		
AT2G26560	4,692	7,38E-50	PHOSPHOLIPASE A 2A (PLA2A)	
AT3G49630	4,599	2,90E-14		
AT1G69920	4,584	1,05E-19	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 12 (GSTU12)	
AT4G15975	4,579	7,93E-32		
AT5G57220	4,461	1,05E-70	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY F, POLYPEPTIDE 2 (CYP81F2)	
AT1G33320	4,385	1,07E-04		
AT4G18195	4,376	1,68E-08	PURINE PERMEASE 8 (PUP8)	
AT3G23250	4,160	2,87E-04	MYB DOMAIN PROTEIN 15 (MYB15)	
AT1G75050	4,150	3,38E-05		
AT2G31945	4,052	7,95E-05		
AT1G15125	4,047	5,56E-133		
AT3G28930	3,950	9,36E-47	AVRRPT2-INDUCED GENE 2 (AIG2)	
AT3G60140	3,940	5,19E-24	DARK INDUCIBLE 2 (DIN2)	
AT4G22690	3,695	2,50E-93	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1 (CYP706A1)	
AT5G65510	3,671	5,86E-04	AINTEGUMENTA-LIKE 7 (AIL7)	
AT1G71280	3,663	2,99E-05		
AT4G30975	3,635	3,16E-03		
AT1G70920	3,623	8,63E-04	HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN 18 (HB18)	
AT2G37430	3,614	2,61E-05		
AT4G22710	3,593	1,65E-139	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 2 (CYP706A2)	
AT4G13820	3,584	8,64E-05		
AT1G64160	3,584	1,31E-11	DIRIGENT PROTEIN 5 (DIR5)	
AT3G09405	3,559	2,72E-09		
AT2G41180	3,535	2,25E-20	SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 2 (SIB2)	

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT1G53990	3,516	3,77E-15	GDSL-MOTIF LIPASE 3 (GLIP3)	
AT3G54640	3,481	6,74E-116	TRYPTOPHAN SYNTHASE ALPHA CHAIN (TSA1)	
AT1G61415	3,480	5,30E-03		
AT5G19160	3,461	1,02E-06	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 11 (TBL11)	
AT4G08780	3,458	7,56E-33		
AT4G39580	3,440	3,01E-12		
AT3G16530	3,395	5,74E-82		
AT3G54150	3,346	5,13E-30		
AT5G04390	3,296	3,82E-04		
AT3G22231	3,293	3,17E-07	PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1 (PCC1)	
AT4G37670	3,280	2,03E-54	N-ACETYL-L-GLUTAMATE SYNTHASE 2 (NAGS2)	
AT2G30870	3,275	5,94E-128	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 10 (GSTF10)	
AT3G50140	3,257	2,72E-13		
AT5G28630	3,244	3,24E-13		
AT5G14180	3,243	1,23E-30	MYZUS PERSICAE-INDUCED LIPASE 1 (MPL1)	
AT2G15760	3,239	1,26E-07		
AT1G02460	3,206	2,19E-04		
AT1G34315	3,193	3,06E-11		
AT2G29460	3,181	1,63E-05	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4 (GSTU4)	
AT2G41178	3,176	1,82E-10		
AT1G75000	3,170	1,59E-22		
AT2G35730	3,164	1,12E-03		
AT4G32510	3,135	7,53E-04		
AT3G28580	3,101	2,25E-04		
AT1G49230	3,092	2,14E-03		
AT5G66658	3,066	1,28E-03		
AT4G08770	3,057	5,06E-68	PEROXIDASE 37 (Prx37)	
AT5G28610	3,048	1,76E-11		
AT5G52720	3,015	3,99E-03		
AT1G10520	3,005	5,94E-04	DNA POLYMERASE {LAMBDA} (Pol{lambda})	
AT2G32960	2,986	1,31E-08	PLANT AND FUNGI ATYPICAL DUAL-SPECIFICITY PHOSPHATASE 2 (PFA-DSP2)	
AT1G11730	2,983	9,37E-03		
AT4G30230	2,931	5,88E-03		
AT3G50190	2,923	4,25E-13		
AT5G62150	2,899	7,54E-10		
AT1G26380	2,885	6,96E-10	FOX1	
AT4G19370	2,844	5,33E-05		
AT3G14225	2,837	5,09E-03	GDSL-MOTIF LIPASE 4 (GLIP4)	
AT4G23280	2,832	4,97E-05	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 20 (CRK20)	
AT4G28550	2,822	6,12E-11		
AT2G47895	2,807	2,96E-03		
AT3G17609	2,806	1,34E-03	HY5-HOMOLOG (HYH)	
AT4G24970	2,794	3,30E-07		
AT2G24600	2,772	8,94E-16		
AT1G80710	2,768	7,89E-20	DROUGHT SENSITIVE 1 (DRS1)	
AT2G32660	2,748	1,62E-03	RECEPTOR LIKE PROTEIN 22 (RLP22)	
AT3G19210	2,743	4,85E-22	HOMOLOG OF RAD54 (RAD54)	
AT4G02482	2,729	3,12E-03		
AT3G26200	2,711	2,86E-11	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 22 (CYP71B22)	
AT2G43000	2,701	1,35E-09	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 42 (NAC042)	
AT1G01740	2,695	1,07E-22		
AT5G23700	2,679	6,88E-03		
AT5G37670	2,679	8,11E-03		
AT3G19615	2,676	6,66E-03		
AT1G24909	2,671	6,87E-09		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT3G56770	2,670	1,32E-03		
AT1G25155	2,641	4,27E-09		
AT4G08555	2,627	8,60E-03		
AT1G15415	2,617	1,77E-11		
AT3G28210	2,616	1,32E-04	(PMZ)	
AT1G68450	2,604	1,45E-03	PIGMENT DEFECTIVE 337 (PDE337)	
AT3G24780	2,602	3,36E-03		
AT5G37478	2,576	9,07E-03		
AT4G20780	2,573	3,71E-36	CALMODULIN LIKE 42 (CML42)	
AT4G26120	2,556	3,04E-07		
AT1G66090	2,546	2,99E-03		
AT1G02920	2,524	8,02E-39	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 7 (GSTF7)	
AT2G38860	2,516	8,98E-39	(YLS5)	
AT2G15490	2,502	2,09E-41	UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 73B4 (UGT73B4)	
AT4G36500	2,502	1,38E-25		
AT2G36970	2,500	2,45E-17		
AT1G07620	2,493	5,47E-07	(ATOBGM)	
AT5G05490	2,473	3,84E-10	SYNAPTIC 1 (SYN1)	
AT4G30530	2,462	8,47E-59	GAMMA-GLUTAMYL PEPTIDASE 1 (GGP1)	
AT5G04340	2,459	5,23E-23	ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6 (ZAT6)	
AT1G33030	2,450	1,72E-04		
AT2G41730	2,450	8,28E-05		
AT1G21130	2,442	2,10E-84	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 4 (IGMT4)	
AT5G41880	2,434	3,43E-04	(POLA3)	
AT1G10990	2,420	3,12E-27		
AT3G63380	2,416	6,61E-26		
AT5G65600	2,394	3,56E-04		
AT1G30420	2,363	1,08E-16	ATP-BINDING CASSETTE C11 (ABCC11)	
AT2G20835	2,348	6,57E-03		
AT5G04310	2,318	5,38E-13		
AT1G02930	2,316	3,31E-24	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6 (GSTF6)	
AT1G74150	2,314	5,52E-04		
AT5G53990	2,312	2,78E-07		
AT1G23550	2,306	4,71E-03	SIMILAR TO RCD ONE 2 (SRO2)	
AT4G31500	2,303	3,36E-72	CYTOCHROME P450, FAMILY 83, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 1 (CYP83B1)	
AT5G23510	2,280	1,44E-19		
AT2G36010	2,274	8,58E-22	E2F TRANSCRIPTION FACTOR 3 (E2F3)	
AT1G21110	2,269	6,43E-49	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 3 (IGMT3)	
AT1G21100	2,264	2,09E-46	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 1 (IGMT1)	
AT3G16150	2,254	4,39E-08	ASPARAGINASE B1 (ASPGB1)	
AT1G19020	2,244	1,17E-13		
AT2G15480	2,239	3,84E-52	UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 73B5 (UGT73B5)	
AT5G05730	2,226	1,30E-55	ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBUNIT 1 (ASA1)	
AT4G25940	2,223	1,21E-39		
AT3G05937	2,217	1,00E-13		
AT1G61400	2,192	4,03E-06		
AT1G21120	2,189	2,09E-25	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 2 (IGMT2)	
AT4G10510	2,186	1,30E-03		
AT1G08310	2,185	2,64E-03		
AT5G45220	2,182	1,64E-04		
AT1G17950	2,178	9,18E-03	MYB DOMAIN PROTEIN 52 (MYB52)	
AT1G18570	2,177	1,59E-25	MYB DOMAIN PROTEIN 51 (MYB51)	
AT3G21780	2,155	4,28E-05	UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 71B6 (UGT71B6)	
AT4G21326	2,151	2,00E-05	SUBTILASE 3,12 (SBT3,12)	
AT1G60110	2,135	8,76E-03		
AT1G55450	2,133	5,41E-33		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT3G45290	2,133	6,21E-05	MILDEW RESISTANCE LOCUS O 3 (MLO3)	
AT2G43120	2,131	4,39E-19		
AT2G22880	2,130	3,65E-05		
AT2G23680	2,128	7,31E-10		
AT1G05575	2,123	1,86E-03		
AT1G78860	2,109	6,55E-15		
AT3G04640	2,105	3,52E-07		
AT5G25570	2,098	2,84E-03		
AT4G28085	2,085	4,58E-04		
AT1G62200	2,080	2,39E-38	PEPTIDE TRANSPORTER 6 (PTR6)	
AT1G28190	2,078	9,18E-16		
AT4G18197	2,078	1,63E-29	PURINE PERMEASE 7 (PUP7)	
AT5G43403	2,074	1,28E-03		
AT5G10520	2,073	9,18E-23	ROP BINDING PROTEIN KINASES 1 (RBK1)	
AT3G25250	2,061	4,08E-04	(AGC2-1)	
AT3G62780	2,059	6,29E-03		
AT1G16445	2,043	3,16E-11		
AT1G78865	2,042	6,06E-05		
AT5G24850	2,028	6,18E-11	CRYPTOCHROME 3 (CRY3)	
AT5G16860	2,023	1,66E-08		
AT3G09940	2,022	1,62E-15	MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE (MDHAR)	
AT3G53160	1,993	1,10E-03	UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 73C7 (UGT73C7)	
AT1G25220	1,993	2,02E-26	ANTHRANILATE SYNTHASE BETA SUBUNIT 1 (ASB1)	
AT5G38140	1,983	6,96E-04	NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C12 (NF-YC12)	
AT5G27630	1,976	4,09E-03	ACYL-COA BINDING PROTEIN 5 (ACBP5)	
AT4G00970	1,971	8,22E-03	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 41 (CRK41)	
AT1G03650	1,966	9,90E-05		
AT1G23830	1,955	1,30E-05		
AT4G18205	1,948	1,46E-33		
AT3G48180	1,947	4,98E-03		
AT2G35035	1,946	8,16E-03	UREASE ACCESSORY PROTEIN D (URED)	
AT1G25083	1,942	7,35E-05		
AT1G55850	1,940	5,64E-72	CELLULOSE SYNTHASE LIKE E1 (CSLE1)	
AT2G22730	1,937	8,83E-03		
AT1G51890	1,932	3,91E-05		
AT1G34340	1,931	1,38E-08		
AT1G64065	1,922	1,07E-07		
AT3G50130	1,921	7,57E-03		
AT2G22250	1,913	3,61E-27	ASPARTATE AMINOTRANSFERASE (AAT)	
AT1G01340	1,910	2,71E-07	CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 10 (CNGC10)	
AT1G08940	1,903	1,72E-13		
AT1G48260	1,894	2,15E-05	CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 17 (CIPK17)	
AT1G07128	1,893	1,71E-11		
AT5G47910	1,890	1,08E-43	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D (RBOHD)	
AT4G17490	1,888	1,20E-11	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 6 (ERF6)	
AT5G56520	1,879	1,60E-08		
AT1G16130	1,865	1,46E-03	WALL ASSOCIATED KINASE-LIKE 2 (WAKL2)	
AT3G47675	1,855	5,31E-03		
AT3G26830	1,843	1,06E-03	PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (PAD3)	
AT1G76170	1,840	2,42E-03		
AT1G24807	1,832	1,71E-05		
AT1G07135	1,828	4,68E-10		
AT1G07130	1,826	3,13E-11	(STN1)	
AT1G29290	1,825	4,82E-03		
AT3G21520	1,820	7,67E-03	DUF679 DOMAIN MEMBRANE PROTEIN 1 (DMP1)	
AT3G10400	1,814	2,48E-07	U11/U12-31K (U11/U12-31K)	
AT1G67148	1,814	6,56E-05		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT1G10040	1,811	2,01E-03		
AT5G22794	1,805	1,94E-03		
AT4G33050	1,794	2,18E-11	EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 39 (EDA39)	
AT2G45920	1,794	7,14E-09		
AT3G09020	1,793	3,39E-07		
AT1G23940	1,792	8,98E-03		
AT1G60730	1,790	1,51E-37		
AT4G18372	1,788	7,58E-04		
AT3G49410	1,785	7,64E-03		
AT3G13780	1,781	2,07E-08		
AT5G52320	1,780	1,87E-04	CYTOCHROME P450, FAMILY 96, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 4 (CYP96A4)	
AT1G49490	1,776	6,29E-09		
AT1G15040	1,769	2,41E-24	GLUTAMINE AMIDOTRANSFERASE 1_2,1 (GAT1_2,1)	
AT1G27500	1,762	3,51E-07		
AT3G62410	1,760	5,17E-33	CP12 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (CP12-2)	
AT3G20480	1,754	8,30E-03	LIPID X K (LPXK)	
AT5G22300	1,752	3,01E-07	NITRILASE 4 (NIT4)	
AT1G01940	1,739	1,98E-11		
AT4G12970	1,726	7,74E-06	STOMAGEN (STOMAGEN)	
AT3G22235	1,724	5,91E-10		
AT1G04930	1,722	6,09E-09		
AT5G54810	1,722	8,31E-35	TRYPTOPHAN SYNTHASE BETA-SUBUNIT 1 (TSB1)	
AT2G02930	1,720	7,40E-33	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3 (GSTF3)	
AT5G27860	1,718	1,39E-03		
AT5G44480	1,718	9,49E-16	DEFECTIVE UGE IN ROOT (DUR)	
AT4G08035	1,717	2,44E-05		
AT2G05632	1,714	2,26E-04		
AT1G09415	1,705	2,58E-06	NIM1-INTERACTING 3 (NIMIN-3)	
AT1G25400	1,705	3,10E-06		
AT2G29720	1,702	1,23E-11	(CTF2B)	
AT1G67810	1,696	1,34E-08	SULFUR E2 (SUFE2)	
AT5G14710	1,682	2,99E-03		
AT4G23260	1,678	1,46E-03	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 18 (CRK18)	
AT3G02990	1,676	2,23E-04	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A1E (HSFA1E)	
AT1G06160	1,675	1,14E-05	OCTADECANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF 59 (ORA59)	
AT4G35380	1,675	3,16E-20		
AT4G30340	1,673	3,88E-13	DIACYLGLYCEROL KINASE 7 (DGK7)	
AT5G09690	1,672	5,06E-04	MAGNESIUM TRANSPORTER 7 (MGT7)	
AT1G25275	1,663	7,75E-18		
AT1G50970	1,661	1,77E-03		
AT1G66700	1,660	6,68E-04	(PXMT1)	
AT3G57520	1,659	7,68E-16	SEED IMBIBITION 2 (SIP2)	
AT3G19660	1,656	7,19E-07		
AT2G14560	1,652	4,00E-03	LATE UPREGULATED IN RESPONSE TO HYALOPERONOSPORA PARASITICA	
AT2G41100	1,650	1,07E-30	TOUCH 3 (TCH3)	
AT4G37520	1,649	9,81E-27		
AT5G50330	1,647	1,86E-03		
AT3G19150	1,645	2,26E-04	KIP-RELATED PROTEIN 6 (KRP6)	
AT4G02520	1,625	9,91E-47	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 2 (GSTF2)	
AT5G05540	1,622	1,41E-06	SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE 2 (SDN2)	
AT1G27020	1,618	3,99E-10		
AT4G24570	1,616	3,79E-05	DICARBOXYLATE CARRIER 2 (DIC2)	
AT4G39980	1,612	1,45E-26	3-DEOXY-D-ARABINO-HEPTULOSONATE 7-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (DHS1)	
AT1G09421	1,608	5,08E-04		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT4G16260	1,607	2,75E-27		
AT1G27730	1,605	1,73E-07	SALT TOLERANCE ZINC FINGER (STZ)	
AT3G26680	1,604	4,69E-07	SENSITIVE TO NITROGEN MUSTARD 1 (SNM1)	
AT4G29050	1,602	1,71E-03		
AT2G43850	1,597	2,22E-05		
AT5G11260	1,594	1,49E-03	ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5)	
AT1G72900	1,594	2,15E-18		
AT5G19250	1,591	4,17E-19		
AT4G39940	1,588	1,49E-19	APS-KINASE 2 (AKN2)	
AT2G41880	1,587	9,03E-11	GUANYLATE KINASE 1 (GK-1)	
AT4G30820	1,587	4,02E-05		
AT5G48070	1,586	7,26E-06	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE/HYDROLASE 20 (XTH20)	
AT1G14040	1,585	1,40E-11		
AT5G08350	1,580	8,65E-09		
AT5G20230	1,579	8,20E-07	BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN (BCB)	
AT1G76520	1,579	4,98E-24		
AT3G50900	1,578	4,07E-04		
AT2G35960	1,572	2,11E-06	NDR1/HIN1-LIKE 12 (NHL12)	
AT2G05185	1,569	6,89E-03		
AT4G24350	1,562	6,56E-05		
AT5G01830	1,560	6,81E-14	SMALL AUXIN UP RNA 21 (SAUR21)	
AT4G37530	1,556	6,62E-20		
AT1G17330	1,555	4,03E-03		
AT4G38540	1,549	3,77E-17		
AT4G38545	1,545	1,28E-17		
AT5G67170	1,543	1,20E-04		
AT4G25900	1,542	1,00E-28		
AT2G34080	1,541	4,95E-03		
AT4G15030	1,541	4,12E-04		
AT3G47420	1,538	1,19E-11	GLYCEROL-3-PHOSPHATE PERMEASE 1 (G3Pp1)	
AT4G23030	1,538	1,80E-04		
AT1G65190	1,537	1,00E-13		
AT3G18690	1,534	1,57E-14	MAP KINASE SUBSTRATE 1 (MKS1)	
AT3G58020	1,532	7,52E-06		
AT1G53430	1,531	5,95E-25		
AT3G23610	1,530	7,42E-04	DUAL SPECIFICITY PROTEIN PHOSPHATASE 1 (DSPTP1)	
AT1G72910	1,529	8,06E-03		
AT4G14710	1,526	5,92E-24	(ATARD2)	
AT2G46430	1,518	3,23E-04	CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 3 (CNGC3)	
AT4G14680	1,506	2,44E-15	(APS3)	
AT5G57565	1,505	3,89E-03		
AT1G10070	1,505	4,94E-04	BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2 (BCAT-2)	
AT4G15130	1,505	6,03E-06	PHOSPHORYLCHOLINE CYTIDYLYLTRANSFERASE2 (CCT2)	
AT1G18745	1,505	6,50E-04		
AT5G14360	1,503	9,51E-03		
AT2G42060	-1,504	8,70E-03		
AT2G40150	-1,514	2,26E-04	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 28 (TBL28)	
AT2G37870	-1,517	1,07E-03		
AT5G03640	-1,520	2,99E-03		
AT3G50640	-1,552	1,30E-03		
AT5G04960	-1,562	2,21E-04		
AT3G06460	-1,563	3,59E-03		
AT3G45700	-1,575	9,79E-04		
AT1G10640	-1,579	9,69E-05		
AT2G32270	-1,580	1,32E-03	ZINC TRANSPORTER 3 PRECURSOR (ZIP3)	
AT4G29180	-1,588	5,16E-03	ROOT HAIR SPECIFIC 16 (RHS16)	
AT5G02170	-1,608	1,19E-03		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT1G65730	-1,610	1,20E-04	YELLOW STRIPE LIKE 7 (YSL7)	
AT3G43190	-1,617	1,14E-03	SUCROSE SYNTHASE 4 (SUS4)	
AT3G56980	-1,631	8,67E-03	(BHLH039)	
AT5G58360	-1,643	3,16E-03	OVATE FAMILY PROTEIN 3 (OFP3)	
AT5G48010	-1,652	2,47E-13	THALIANOL SYNTHASE 1 (THAS1)	
AT5G42580	-1,654	7,54E-10	CYTOCHROME P450, FAMILY 705, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 12	
AT3G46700	-1,655	2,12E-05		
AT3G29250	-1,663	1,30E-10	SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE REDUCTASE 4 (SDR4)	
AT2G44290	-1,677	5,71E-06		
AT1G64590	-1,682	6,79E-06		
AT4G33070	-1,700	1,31E-03		
AT4G37160	-1,701	3,75E-05	SKU5 SIMILAR 15 (sks15)	
AT2G31980	-1,703	2,68E-03	PHYTOCYSTATIN 2 (CYS2)	
AT4G13390	-1,706	2,13E-05	EXTENSIN 12 (EXT12)	
AT5G35940	-1,707	9,11E-05		
AT2G20520	-1,715	3,17E-03	FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN 6 (FLA6)	
AT5G35190	-1,750	3,00E-05	EXTENSIN 13 (EXT13)	
AT1G73120	-1,755	4,71E-03		
ATCG01200	-1,767	8,93E-03	(TRNI,3)	
AT2G36026	-1,777	5,60E-05		
AT3G21370	-1,777	6,07E-05	BETA GLUCOSIDASE 19 (BGLU19)	
AT4G27400	-1,815	6,55E-05		
AT2G46660	-1,822	3,62E-04	CYTOCHROME P450, FAMILY 78, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 6 (CYP78A6)	
AT1G16440	-1,824	1,75E-03	ROOT HAIR SPECIFIC 3 (RSH3)	
AT2G30760	-1,835	5,38E-04		
AT2G32510	-1,841	3,18E-04	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 17 (MAPKKK17)	
AT1G34510	-1,851	3,54E-04		
AT2G37390	-1,865	8,00E-06	SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE 2 (NAKR2)	
AT5G46890	-1,890	1,44E-09		
AT1G73810	-1,896	7,07E-03		
AT1G52890	-1,940	4,48E-03	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 19 (NAC019)	
AT1G73220	-1,962	8,68E-03	ORGANIC CATION/CARNITINE TRANSPORTER1 (OCT1)	
AT1G35330	-1,973	2,19E-04		
AT5G51500	-1,974	1,19E-03		
AT1G01580	-1,983	5,81E-03	FERRIC REDUCTION OXIDASE 2 (FRO2)	
AT5G52300	-1,986	2,66E-03	LOW-TEMPERATURE-INDUCED 65 (LTI65)	
AT4G38390	-1,991	8,19E-03	ROOT HAIR SPECIFIC 17 (RHS17)	
AT5G16190	-2,065	6,55E-03	CELLULOSE SYNTHASE LIKE A11 (CSLA11)	
AT5G52390	-2,083	8,77E-03		
AT2G36640	-2,096	3,26E-03	EMBRYONIC CELL PROTEIN 63 (ECP63)	
AT1G76610	-2,117	2,51E-03		
AT1G05700	-2,200	3,11E-03		
AT5G05340	-2,208	3,94E-04	PEROXIDASE 52 (PRX52)	
AT1G48130	-2,219	5,38E-04	1-CYSTEINE PEROXIREDOXIN 1 (PER1)	
AT2G41240	-2,253	4,47E-03	BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 100 (BHLH100)	
AT1G55060	-2,270	7,37E-03	UBIQUITIN 12 (UBQ12)	
AT1G26360	-2,271	7,76E-03	METHYL ESTERASE 13 (MES13)	
AT3G08870	-2,294	8,05E-04		
AT3G53040	-2,312	8,04E-05		
AT2G30820	-2,345	2,57E-03		
AT1G14960	-2,360	1,43E-11		
AT3G46270	-2,364	7,53E-05		
AT4G22610	-2,387	8,64E-07		
AT2G36030	-2,415	8,61E-05		
AT3G21720	-2,605	2,49E-05	ISOCITRATE LYASE (ICL)	

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF106
AT5G62330	-2,702	6,59E-03		
AT1G73190	-2,733	1,58E-04	(TIP3;1)	
AT5G54070	-2,848	5,42E-03	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9 (HSFA9)	
AT5G54075	-2,848	5,42E-03	U3 SMALL NUCLEOLAR RNAD (U3D)	
AT4G01080	-2,853	4,76E-04	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 26 (TBL26)	
AT5G06760	-3,022	7,57E-04	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4-5 (LEA4-5)	
AT2G32610	-3,189	1,64E-03	CELLULOSE SYNTHASE-LIKE B1 (CSLB01)	
AT4G01985	-3,223	8,22E-05		
AT4G19690	-3,290	4,94E-10	IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1)	
AT1G72100	-3,327	6,53E-04		
AT1G03790	-3,631	1,62E-04	SOMNUS (SOM)	
AT3G11260	-3,808	4,34E-03	WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5)	
AT5G52600	-4,183	7,57E-03	MYB DOMAIN PROTEIN 82 (MYB82)	
AT2G47770	-4,208	1,53E-06	TSPO(OUTER MEMBRANE TRYPTOPHAN-RICH SENSORY PROTEIN)-RELATED	
ATCG00970	-4,384	4,20E-05	RIBOSOMAL RNA5S (RRN5S)	
AT3G15670	-4,580	8,79E-08		
AT1G68250	-4,634	3,88E-05		
AT5G54740	-4,662	4,95E-05	SEED STORAGE ALBUMIN 5 (SESA5)	
AT4G27170	-4,682	7,22E-03	SEED STORAGE ALBUMIN 4 (SESA4)	
AT3G51810	-4,774	5,45E-05	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 1 (EM1)	
AT3G21800	-5,753	1,42E-03	UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 71B8 (UGT71B8)	

Tabelle 8.6 Auflistung der differentiell exprimierten Genen in den Funktionsgewinn-Mutanten XVE:ERF107 nach β -Estradiol-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,5$ ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF107
AT4G28420	7,001	4,94E-06		
AT2G17740	6,319	2,74E-24		
AT4G31970	6,232	4,60E-23	CYTOCHROME P450, FAMILY 82, SUBFAMILY C, POLYPEPTIDE 2 (CYP82C2)	
AT1G26390	6,055	2,25E-32		
AT5G24110	6,012	2,34E-04	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 30 (WRKY30)	
AT4G14450	5,888	6,33E-05		
AT2G18660	5,879	2,70E-04	PLANT NATRIURETIC PEPTIDE A (PNP-A)	
AT1G26380	5,823	1,13E-32	FOX1	
AT2G25440	5,672	5,84E-04	RECEPTOR LIKE PROTEIN 20 (RLP20)	
AT5G37490	5,664	1,43E-03		
AT5G25260	5,346	5,90E-11		
AT1G26410	5,287	1,61E-18		
AT2G19190	5,106	3,10E-13	FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1 (FRK1)	
AT2G43620	4,887	4,34E-26		
AT1G67980	4,797	5,05E-05	CAFFEOYL-COA 3-O-METHYLTRANSFERASE (CCOAMT)	
AT4G12490	4,646	2,24E-15		
AT5G61890	4,606	2,86E-03		
AT5G40990	4,292	3,38E-05	GDSL LIPASE 1 (GLIP1)	
AT5G24640	4,205	6,40E-04		
AT2G30750	4,075	1,63E-32	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 12 (CYP71A12)	
AT1G47890	4,023	6,05E-05	RECEPTOR LIKE PROTEIN 7 (RLP7)	
AT4G11170	4,016	2,51E-06		
AT4G35180	4,000	2,91E-04	LYS/HIS TRANSPORTER 7 (LHT7)	
AT1G05675	3,909	6,63E-06		
AT3G18250	3,906	2,54E-06		
AT4G12500	3,892	1,20E-19		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF107
AT5G12020	3,781	2,82E-35	17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN (HSP17.6II)	
AT4G23150	3,720	5,29E-03	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 7 (CRK7)	
AT3G48850	3,638	4,26E-04	PHOSPHATE TRANSPORTER 3;2 (PHT3;2)	
AT4G26200	3,519	5,37E-08	1-AMINO-CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 7 (ACS7)	
AT4G14365	3,511	5,57E-13	XB3 ORTHOLOG 4 IN ARABIDOPSIS THALIANA (XBAT34)	
AT4G38560	3,510	3,03E-06		
AT1G52560	3,509	2,69E-22		
AT1G53540	3,499	1,58E-08		
AT1G11610	3,470	5,08E-03	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 18 (CYP71A18)	
AT1G26420	3,469	4,60E-23		
AT4G11890	3,444	8,89E-15	ABA- AND OSMOTIC-STRESS-INDUCIBLE RECEPTOR-LIKE CYTOSOLIC KINASE1	
AT3G23250	3,438	8,44E-06	MYB DOMAIN PROTEIN 15 (MYB15)	
AT1G79680	3,388	1,12E-10	WALL ASSOCIATED KINASE (WAK)-LIKE 10 (WAKL10)	
AT1G16150	3,381	6,48E-08	WALL ASSOCIATED KINASE-LIKE 4 (WAKL4)	
AT5G48430	3,336	1,24E-10		
AT4G23220	3,316	1,17E-13	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 14 (CRK14)	
AT1G21240	3,302	1,25E-05	WALL ASSOCIATED KINASE 3 (WAK3)	
AT1G01560	3,265	4,34E-03	MAP KINASE 11 (MPK11)	
AT5G52750	3,229	1,32E-06		
AT4G31950	3,199	7,80E-03	CYTOCHROME P450, FAMILY 82, SUBFAMILY C, POLYPEPTIDE 3 (CYP82C3)	
AT5G57220	3,184	3,00E-38	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY F, POLYPEPTIDE 2 (CYP81F2)	
AT1G51820	3,167	3,10E-08		
AT2G44370	3,094	1,04E-09		
AT1G05680	3,086	2,71E-16	URIDINE DIPHOSPHATE GLYCOSYLTRANSFERASE 74E2 (UGT74E2)	
AT2G40180	3,060	5,90E-03	PHOSPHATASE 2C5 (PP2C5)	
AT3G28580	3,036	1,97E-05		
AT2G26010	3,034	6,52E-03	PLANT DEFENSIN 1.3 (PDF1.3)	
AT4G18250	3,020	8,96E-07		
AT5G44568	3,003	3,14E-04		
AT1G65500	2,991	1,70E-06		
AT5G36925	2,970	1,14E-05		
AT1G13480	2,939	3,24E-04		
AT4G25200	2,921	1,01E-18	MITOCHONDRION-LOCALIZED SMALL HEAT SHOCK PROTEIN 23.6	
AT1G02930	2,898	4,78E-38	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6 (GSTF6)	
AT1G69920	2,870	6,80E-06	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 12 (GSTU12)	
AT2G26560	2,867	1,93E-20	PHOSPHOLIPASE A 2A (PLA2A)	
AT4G37370	2,849	5,02E-55	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY D, POLYPEPTIDE 8 (CYP81D8)	
AT5G39580	2,847	4,52E-17		
AT1G32350	2,837	3,33E-03	ALTERNATIVE OXIDASE 1D (AOX1D)	
AT1G14540	2,827	3,05E-04	PEROXIDASE 4 (PER4)	
AT2G39200	2,811	1,48E-12	MILDEW RESISTANCE LOCUS O 12 (MLO12)	
AT2G04040	2,806	2,27E-04	DETOXIFICATION 1 (DTX1)	
AT5G12030	2,775	9,92E-24	HEAT SHOCK PROTEIN 17.6A (HSP17.6A)	
AT5G44585	2,759	8,87E-04		
AT4G18195	2,751	3,38E-03	PURINE PERMEASE 8 (PUP8)	
AT2G43140	2,739	4,01E-04		
AT1G53625	2,711	2,11E-07		
AT2G25470	2,692	5,94E-03	RECEPTOR LIKE PROTEIN 21 (RLP21)	
AT4G13420	2,687	3,86E-17	HIGH AFFINITY K+ TRANSPORTER 5 (HAK5)	
AT1G75040	2,681	3,05E-11	PATHOGENESIS-RELATED GENE 5 (PR5)	
AT4G03460	2,678	9,51E-05		
AT1G07400	2,657	3,35E-25		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF107
AT5G11210	2,648	9,08E-03	GLUTAMATE RECEPTOR 2.5 (GLR2.5)	
AT5G25250	2,634	4,24E-09	FLOTILLIN 1 (FLOT1)	
AT3G46230	2,611	3,89E-23	HEAT SHOCK PROTEIN 17.4 (HSP17.4)	
AT5G54710	2,610	1,81E-18		
AT1G59860	2,563	8,45E-13		
AT4G10250	2,545	2,00E-04	(ATHSP22.0)	
AT5G59720	2,544	1,54E-10	HEAT SHOCK PROTEIN 18.2 (HSP18.2)	
AT1G51800	2,522	5,19E-12	IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY 1 (IOS1)	
AT1G13520	2,517	1,50E-06		
AT2G40330	2,514	3,55E-05	PYR1-LIKE 6 (PYL6)	
AT5G54720	2,490	1,59E-06		
AT4G25110	2,481	9,48E-09	METACASPASE 2 (MC2)	
AT1G15520	2,472	3,31E-09	ATP-BINDING CASSETTE G40 (ABCG40)	
AT1G60750	2,465	1,38E-05		
AT1G51890	2,464	1,58E-09		
AT4G22470	2,454	9,77E-07		
AT5G64120	2,453	2,52E-13		
AT5G42830	2,452	1,20E-07		
AT2G29350	2,391	3,45E-05	SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 13 (SAG13)	
AT1G09240	2,377	7,39E-05	NICOTIANAMINE SYNTHASE 3 (NAS3)	
AT1G76650	2,376	8,57E-04	CALMODULIN-LIKE 38 (CML38)	
AT5G38900	2,371	1,22E-05		
AT1G66090	2,356	4,76E-05		
AT1G65486	2,355	2,26E-04		
AT1G02920	2,350	3,89E-35	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 7 (GSTF7)	
AT5G61160	2,325	2,83E-08	ANTHOCYANIN 5-AROMATIC ACYLTRANSFERASE 1 (AACT1)	
AT3G58190	2,321	2,88E-03	LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 29 (LBD29)	
AT4G23170	2,319	1,57E-12	(EP1)	
AT2G43590	2,294	2,09E-25		
AT4G27670	2,285	3,85E-05	HEAT SHOCK PROTEIN 21 (HSP21)	
AT3G16530	2,280	9,59E-41		
AT1G61340	2,276	3,62E-03	F-BOX STRESS INDUCED 1 (FBS1)	
AT1G27730	2,274	6,59E-20	SALT TOLERANCE ZINC FINGER (STZ)	
AT3G15356	2,270	1,26E-36		
AT3G28210	2,254	1,36E-05	(PMZ)	
AT4G02330	2,253	1,61E-07	(ATPMEPCRB)	
AT2G41730	2,243	8,25E-07		
AT2G29460	2,223	2,06E-06	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4 (GSTU4)	
AT3G46280	2,212	2,23E-13		
AT3G22060	2,206	6,02E-17		
AT3G50480	2,202	5,37E-08	HOMOLOG OF RPW8 4 (HR4)	
AT2G32030	2,174	1,10E-03		
AT3G26830	2,158	1,36E-13	PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (PAD3)	
AT4G21380	2,147	1,12E-08	RECEPTOR KINASE 3 (RK3)	
AT1G59500	2,110	3,77E-03	(GH3.4)	
AT2G16060	2,099	1,06E-03	HEMOGLOBIN 1 (HB1)	
AT4G37390	2,096	8,70E-20	(BRU6)	
AT1G21250	2,095	3,65E-11	CELL WALL-ASSOCIATED KINASE (WAK1)	
AT2G34390	2,053	6,88E-03	NOD26-LIKE INTRINSIC PROTEIN 2;1 (NIP2;1)	
AT2G38870	2,049	2,17E-14		
AT1G21326	2,026	8,68E-03		
AT5G42530	2,026	1,84E-09		
AT4G33050	2,025	3,53E-17	EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 39 (EDA39)	
AT2G27389	2,017	5,05E-03		
AT1G19020	2,005	3,32E-14		
AT5G59820	1,943	1,51E-10	RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41 (RHL41)	
AT2G47520	1,925	2,11E-04	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 71 (ERF71)	

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF107
AT1G72060	1,923	1,88E-07		
AT2G39518	1,923	1,43E-06		
AT5G39670	1,903	9,11E-03		
AT4G08555	1,897	5,23E-03		
AT5G26920	1,895	6,13E-07	CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G (CBP60G)	
AT3G16150	1,886	3,44E-09	ASPARAGINASE B1 (ASPGB1)	
AT2G19990	1,874	2,60E-04	PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN-1-LIKE (PR-1-LIKE)	
AT4G08770	1,868	4,71E-18	PEROXIDASE 37 (Prx37)	
AT2G43570	1,866	5,19E-12	CHITINASE, PUTATIVE (CHI)	
AT1G16030	1,866	8,26E-37	HEAT SHOCK PROTEIN 70B (Hsp70b)	
AT2G36690	1,858	4,20E-04		
AT4G32810	1,835	3,53E-03	CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 (CCD8)	
AT2G29500	1,834	7,95E-34		
AT2G41100	1,832	1,31E-42	TOUCH 3 (TCH3)	
AT5G46050	1,782	4,79E-03	PEPTIDE TRANSPORTER 3 (PTR3)	
AT2G24600	1,763	7,37E-08		
AT4G14400	1,761	1,16E-07	ACCELERATED CELL DEATH 6 (ACD6)	
AT3G23550	1,760	6,37E-10		
AT1G15125	1,760	2,60E-28		
AT3G54150	1,740	9,72E-07		
AT2G18680	1,738	3,93E-03		
AT5G48540	1,725	5,21E-11		
AT1G49860	1,718	3,28E-04	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (CLASS PHI) 14 (GSTF14)	
AT1G30730	1,717	1,22E-20		
AT2G26150	1,707	2,22E-05	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A2 (HSFA2)	
AT2G41230	1,704	4,97E-03	ORGAN SIZE RELATED 1 (ORS1)	
AT2G02930	1,690	9,08E-36	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3 (GSTF3)	
AT4G26120	1,687	5,23E-06		
AT4G27290	1,686	4,42E-05		
AT2G27660	1,683	4,33E-06		
AT1G49000	1,682	1,93E-04		
AT1G72520	1,682	2,15E-03	LIPOXYGENASE 4 (LOX4)	
AT2G41231	1,674	6,02E-03		
AT5G37670	1,649	3,71E-04		
AT3G26200	1,645	1,21E-03	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 22 (CYP71B22)	
AT5G06860	1,644	1,94E-23	POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN 1 (PGIP1)	
AT2G18690	1,643	9,32E-08		
AT3G26500	1,642	1,60E-05	PLANT INTRACELLULAR RAS GROUP-RELATED LRR 2 (PIRL2)	
AT5G06865	1,641	3,58E-23		
AT1G08430	1,638	9,43E-10	ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1 (ALMT1)	
AT5G25910	1,635	8,07E-04	RECEPTOR LIKE PROTEIN 52 (RLP52)	
AT1G54050	1,629	4,82E-09		
AT5G47230	1,622	8,09E-07	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 5 (ERF5)	
AT2G43000	1,621	6,44E-03	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 42 (NAC042)	
AT5G54165	1,613	1,13E-03		
AT5G20230	1,607	5,10E-08	BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN (BCB)	
AT1G51850	1,604	6,85E-08		
AT1G51790	1,596	6,10E-03		
AT4G02520	1,591	1,92E-44	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 2 (GSTF2)	
AT1G72070	1,585	1,52E-04		
AT3G49620	1,584	2,52E-03	DARK INDUCIBLE 11 (DIN11)	
AT1G75000	1,583	3,79E-07		
AT5G44910	1,578	2,51E-05		
AT2G25735	1,578	1,81E-05		
AT1G77120	1,574	6,12E-03	ALCOHOL DEHYDROGENASE 1 (ADH1)	
AT4G00080	1,574	5,69E-05	UNFERTILIZED EMBRYO SAC 11 (UNE11)	

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PADJUST	PRIMARY GENE SYMBOL	XVE:ERF107
AT1G30700	1,548	2,52E-13		
AT5G41750	1,540	2,40E-04		
AT2G19970	1,532	6,02E-07		
AT3G15340	1,530	7,00E-05	PROTON PUMP INTERACTOR 2 (PPI2)	
AT5G16170	1,529	8,57E-03		
AT5G27420	1,512	4,52E-17	CARBON/NITROGEN INSENSITIVE 1 (CNI1)	
AT2G25510	1,502	1,05E-07		
AT3G21370	-1,508	1,98E-07	BETA GLUCOSIDASE 19 (BGLU19)	
AT4G19690	-1,548	4,26E-04	IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1)	
AT1G05660	-1,551	9,50E-05		
AT3G02480	-1,615	6,44E-04		
AT1G13650	-1,632	3,03E-03		
AT5G04150	-1,741	7,72E-05	(BHLH101)	
AT3G17520	-1,741	2,16E-06		
AT2G35300	-1,781	1,66E-04	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 18 (LEA18)	
AT1G04560	-1,826	6,39E-03		
AT3G56980	-1,964	3,92E-05	(BHLH039)	
AT2G36640	-2,056	1,00E-05	EMBRYONIC CELL PROTEIN 63 (ECP63)	
AT5G10120	-2,225	7,98E-03		
AT2G30766	-2,353	6,46E-13		
AT2G41240	-2,407	1,26E-03	BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 100 (BHLH100)	
AT2G30760	-2,479	2,73E-08		
AT3G56970	-2,531	6,24E-04	(BHLH038)	
AT3G51810	-2,588	4,34E-05	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 1 (EM1)	
AT4G36700	-2,944	2,11E-07		
AT5G22470	-3,543	1,47E-04		
AT1G13609	-3,594	1,46E-08		

Tabelle 8.7 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 4.12 (aktivierte Gene durch ERF106 und ERF107). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF106 UND ERF107 mit einem Induktionswert $\geq 1,5$ ($p \leq 0,01$) aktiviert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF106 UND ERF107
AT1G26380	FAD-binding Berberine family protein (FOX1)	
AT3G28580	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	
AT1G19020		
AT1G75000	GNS1/SUR4 membrane protien family	
AT2G41730		
AT4G08555		
AT3G16530	Lectin like protein	
AT1G15125	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	
AT3G15356	Legume lectin family protein	
AT5G37670	HSP20-like chaperones superfamily protein	
AT4G26120	Ankyrin repeat family protein	
AT3G23550	MATE efflux family protien	
AT1G66090	Disease resistance protein	
AT1G51890	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	
AT2G24600	Ankyrin repeat family protein	
AT3G28210	putative zinc finger protein	
AT3G26200	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 22 (CYP71B22)	
AT5G57220	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY F, POLYPEPTIDE 2 (CYP81F2)	
AT5G61160	ANTHOCYANIN 5-AROMATIC ACYLTRANSFERASE 1 (AACT1)	
AT3G16150	ASPARAGINASE B1 (ASPG1)	
AT5G20230	BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN (BCB)	
AT1G67980	CAFFEYOYL-COA 3-O-METHYLTRANSFERASE (CCOAMT)	

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF106 UND ERF107
AT3G49620	DARK INDUCIBLE 11 (DIN11)	
AT4G33050	EMBRYO SAC DEVELOPMENT ARREST 39 (EDA39)	
AT3G54150	EXINE FORMATION DEFECTIVE (EFD)	
AT1G02930	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6 (GSTF6)	
AT1G02920	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 7 (GSTF7)	
AT2G02930	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3 (GSTF3)	
AT4G02520	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 2 (GSTF2)	
AT1G69920	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 12 (GSTU12)	
AT2G29460	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4 (GSTU4)	
AT3G23250	MYB DOMAIN PROTEIN 15 (MYB15)	
AT2G43000	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 42 (NAC042)	
AT4G08770	PEROXIDASE 37 (Prx37)	
AT2G26560	PHOSPHOLIPASE A 2A (PLA2A)	
AT3G26830	PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (PAD3)	
AT2G26010	PLANT DEFENSIN 1.3 (PDF1.3)	
AT4G18195	PURINE PERMEASE 8 (PUP8)	
AT1G27730	SALT TOLERANCE ZINC FINGER (STZ)	
AT2G41100	TOUCH 3 (TCH3)	

Tabelle 8.8 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 4.12 (inhibierte Gene durch ERF106 und ERF107). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF106 UND ERF107 mit einem Induktionswert $\leq 1,5$ ($p \leq 0,01$) inhibiert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	INHIBIERT DURCH ERF106 UND ERF107
AT2G30760		
AT3G56980	BASIC HELIX-LOOP-HELIX 39 (BHLH39)	
AT2G41240	BASIC HELIX-LOOP-HELIX PROTEIN 100 (BHLH100)	
AT3G21370	BETA GLUCOSIDASE 19 (BGLU19)	
AT2G36640	EMBRYONIC CELL PROTEIN 63 (ECP63)	
AT4G19690	IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1)	
AT3G51810	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 1 (EM1)	

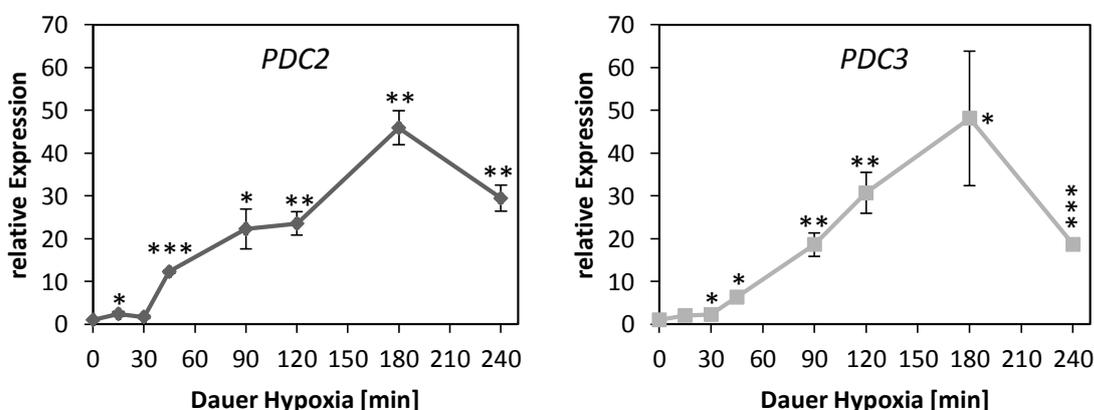


Abbildung 8.5 Relative Expression von PDC2 und PDC3 nach Hypoxia-Stress. Zu verschiedenen Zeitpunkten (15 – 240 min) nach Überflutung wurde die relative Genexpression mittels qRT-PCR in Blatt von zwei Wochen alten Keimlingen (Col-0) analysiert (MW +STABW, n=2, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, t-Test: einseitig, homoskedatisch).

Tabelle 8.9 Auflistung der nach Überflutung in der Mutante *erf106* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,0$ differentiell exprimierten Gene ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PVALUE	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106KO VS. COL-0 (HYPOXIA)
AT5G59240	2,51	1,85E-06		
AT1G32010	1,74	4,13E-07		
AT4G02330	1,61	1,97E-09	PECTIN METHYLESTERASE 41 (PME41)	
AT1G27565	1,42	1,42E-05		
AT1G17180	1,10	1,59E-06	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 25 (GSTU25)	
AT5G25560	-1,02	1,34E-05		
AT1G74810	-1,10	1,10E-06	(BOR5)	
AT3G29390	-1,12	1,23E-06	RS2-INTERACTING KH PROTEIN (RIK)	
AT4G18120	-1,22	3,53E-14	MEI2-LIKE 3 (ML3)	
AT4G36980	-1,24	7,49E-07		
AT5G14180	-1,38	1,47E-05	MYZUS PERSICAE-INDUCED LIPASE 1 (MPL1)	
AT5G38150	-1,43	1,02E-06	PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 15 (PMI15)	
AT2G17430	-1,98	5,74E-06	MILDEW RESISTANCE LOCUS O 7 (MLO7)	
AT5G07580	-3,07	1,17E-71	ERF106	

Tabelle 8.10 Auflistung der nach Überflutung in der Mutante *erf107* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,0$ differentiell exprimierten Gene ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PVALUE	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF107KO VS. COL-0 (HYPOXIA)
AT2G34600	1,54	1,19E-06	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7 (JAZ7)	
AT2G19970	1,51	1,10E-05		
AT1G79075	1,33	4,37E-08		
AT1G31173	1,32	6,44E-07	MICRORNA167D (MIR167D)	
AT4G38860	1,32	1,98E-08		
AT5G62920	1,23	2,20E-05	RESPONSE REGULATOR 6 (ARR6)	
AT2G27690	1,17	9,84E-10	CYTOCHROME P450, FAMILY 94, SUBFAMILY C, POLYPEPTIDE 1 (CYP94C1)	
AT1G28370	1,15	7,39E-06	ERF DOMAIN PROTEIN 11 (ERF11)	
AT4G28290	1,09	1,22E-07		
AT5G25340	1,07	7,54E-13		
AT2G32270	1,07	3,30E-05	ZINC TRANSPORTER 3 PRECURSOR (ZIP3)	
AT1G19050	1,06	3,16E-05	RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7)	
AT1G65970	1,06	4,95E-07	THIOREDOXIN-DEPENDENT PEROXIDASE 2 (TPX2)	
AT4G18250	-1,00	1,05E-07		
AT2G36970	-1,01	1,25E-12		
AT1G10990	-1,08	2,04E-05		
AT3G54150	-1,11	2,74E-06		
AT4G29110	-1,11	2,55E-05		
AT1G63350	-1,17	1,28E-05		
AT5G11330	-1,22	2,44E-11		
AT1G03760	-1,23	7,42E-06		
AT4G11000	-1,45	3,30E-05		
AT1G16420	-1,52	4,34E-05	METACASPASE 8 (MC8)	
AT3G10040	-1,56	1,81E-05		
AT3G19210	-1,87	1,82E-06	HOMOLOG OF RAD54 (RAD54)	
AT2G34880	-2,76	3,27E-05	MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 27 (MEE27)	
AT1G67920	-5,51	3,83E-05		
AT2G42220	-5,92	4,93E-179		
AT5G61590	-6,13	8,24E-158	ERF107	

Tabelle 8.11 Auflistung der nach Überflutung in der Mutante *erf106xrf107* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einem Induktionswert $\geq \pm 1,0$ differentiell exprimierten Gene ($p \leq 0,01$). Fettgedruckt sind die im Text besprochenen Gene.

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PVALUE	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106XERF107KO VS. COL-0 (HYPOXIA)
AT4G14548	2,37	2,10E-10		
AT1G31430	2,08	2,58E-05		
AT2G19970	1,58	3,81E-06		
AT1G52827	1,38	9,05E-07	CADMIUM TOLERANCE 1 (CDT1)	
AT1G45616	1,32	2,73E-05	RECEPTOR LIKE PROTEIN 6 (RLP6)	
AT3G44860	1,32	4,77E-10	FARNESOIC ACID CARBOXYL-O-METHYLTRANSFERASE (FAMT)	
AT1G10585	1,10	7,67E-07		
AT5G24150	1,05	2,83E-09	SQUALENE MONOOXYGENASE 5 (SQE5); (SQP1)	
AT3G03000	-1,01	5,11E-05		
AT4G36500	-1,01	3,18E-06		
AT5G23510	-1,03	7,76E-12		
AT5G60460	-1,04	3,15E-05		
AT1G21140	-1,04	1,74E-05		
AT3G16530	-1,06	5,55E-11		
AT5G22250	-1,07	3,28E-07	CCR4- ASSOCIATED FACTOR 1B (CAF1b)	
AT1G59960	-1,07	2,19E-07		
AT2G26560	-1,07	2,20E-09	PHOSPHOLIPASE A 2A (PLA2A)	
AT2G30870	-1,09	4,04E-14	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 10 (GSTF10)	
AT1G06800	-1,10	2,05E-07	PHOSPHOLIPASE A I GAMMA 1 (PLA-I{gamma}1)	
AT2G29740	-1,11	3,16E-07	UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 71C2 (UGT71C2)	
AT2G30550	-1,12	1,45E-09		
AT1G04930	-1,14	3,76E-06		
AT4G02520	-1,15	7,20E-08	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 2 (GSTF2)	
AT1G80240	-1,15	1,24E-05	DUF642 L-GALL RESPONSIVE GENE 1 (DGR1)	
AT1G33590	-1,16	4,43E-11		
AT1G18570	-1,17	5,47E-16	MYB DOMAIN PROTEIN 51 (MYB51)	
AT2G02930	-1,17	9,35E-12	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3 (GSTF3)	
AT2G24600	-1,17	4,37E-07		
AT1G75040	-1,18	2,65E-06	PATHOGENESIS-RELATED GENE 5 (PR5)	
AT1G27020	-1,18	1,15E-09		
AT2G20950	-1,18	6,94E-10		
AT1G27130	-1,19	6,88E-16	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 13 (GSTU13)	
AT1G77210	-1,22	1,87E-08	SUGAR TRANSPORT PROTEIN 14 (STP14)	
AT3G09020	-1,24	3,42E-05		
AT4G14400	-1,25	1,25E-06	ACCELERATED CELL DEATH 6 (ACD6)	
AT1G66090	-1,28	4,58E-07		
AT5G26270	-1,30	1,93E-08		
AT1G63350	-1,30	9,18E-07		
AT1G21130	-1,31	1,53E-17	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 4 (IGMT4)	
AT1G23830	-1,31	7,37E-06		
AT1G57630	-1,32	2,17E-05		
AT3G54150	-1,33	2,29E-08		
AT4G18250	-1,34	3,06E-12		
AT4G06746	-1,36	8,20E-13	RELATED TO AP2 9 (RAP2.9)	
AT1G15125	-1,38	2,82E-08		
AT1G78460	-1,43	1,03E-09		
AT1G73805	-1,44	1,77E-05	SAR DEFICIENT 1 (SARD1)	
AT4G22710	-1,48	2,45E-15	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 2 (CYP706A2)	
AT5G26920	-1,53	1,76E-22	CAM-BINDING PROTEIN 60-LIKE G (CBP60G)	
AT5G39020	-1,56	7,74E-17		
AT3G22235	-1,61	5,52E-07		

AT-NUMMER	LOG ₂ FC	PVALUE	PRIMARY GENE SYMBOL	ERF106XERF107KO VS. COL-0 (HYPOXIA)
AT4G22690	-1,62	1,06E-19	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1 (CYP706A1)	
AT1G25275	-1,72	3,50E-23		
AT4G25940	-1,74	8,21E-16		
AT4G18205	-1,85	1,42E-19		
AT5G28630	-1,89	4,47E-13		
AT4G18197	-1,94	7,64E-17	PURINE PERMEASE 7 (PUP7)	
AT1G10990	-2,17	7,98E-14		
AT4G29050	-2,28	2,64E-09		
AT3G26200	-2,29	1,70E-21	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 22 (CYP71B22)	
AT4G39580	-2,74	4,80E-09		
AT1G73010	-2,98	5,24E-05	PHOSPHATE STARVATION-INDUCED GENE 2 (PS2)	
AT1G23110	-3,38	3,93E-05		
AT5G07580	-3,54	7,94E-85	ERF106	
AT3G22231	-4,05	5,12E-11	PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1 (PCC1)	
AT1G52270	-4,43	1,42E-07		
AT3G27040	-5,01	3,00E-07		
AT2G42220	-5,58	8,73E-178		
AT5G61590	-6,58	5,37E-170	ERF107	

Tabelle 8.12 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 5.1 (ERF106, ERF107 und oxidativer Stress). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF106 und ERF107 mit einem Induktionswert $\geq 1,0$ ($p \leq 0,01$) sowie nach Behandlung mit verschiedenen Chemikalien, die oxidativen Stress induzieren (Ozon, Methylviologen, Alternaria alternata Toxin, 3-Aminotriazol) aus (Gadjev et al, 2006) aktiviert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF106, ERF107 UND OXIDATIVEN STRESS
AT1G26380	FAD-binding Berberine family protein (FOX1)	
AT3G54150	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	
AT3G28210	putative Zinc-finger protein	
AT3G49620	DARK INDUCIBLE 11 (DIN11)	
AT2G29460	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4 (GSTU4)	
AT3G26830	PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (PAD3)	

Tabelle 8.13 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 5.1 (ERF107 und oxidativer Stress). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF107 mit einem Induktionswert $\geq 1,0$ ($p \leq 0,01$) sowie nach Behandlung mit verschiedenen Chemikalien, die oxidativen Stress induzieren (Ozon, Methylviologen, Alternaria alternata Toxin, 3-Aminotriazol) aus (Gadjev et al, 2006) aktiviert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF107 UND OXIDATIVEN STRESS
AT4G01870	TolB-protein related	
AT4G22530	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	
AT2G41380	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	
AT1G26420	FAD-binding Berberine family protein	
AT1G13340		
AT3G08970	THERMOSENSITIVE MALE STERILE 1 (TMS1); (ATERDJ3A)	
AT4G37370	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY D, POLYPEPTIDE 8 (CYP81D8)	
AT1G17170	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 24 (GSTU24)	

Tabelle 8.14 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 5.3 (aktivierte Gene durch ERF106 und Verticillium-Infektion). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF106 mit einem Induktionswert $\geq 1,5$ ($p \leq 0,01$) sowie nach Infektion mit Verticillium longisporum (3dpi, $\log_2FC \geq 2,0$) aus (Iven et al, 2012) aktiviert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF106 UND VERTICILLIUM-INFESTION
AT4G08780	Peroxidase superfamily	
AT5G52720	Copper transport protein family	
AT3G63380	ATPase E1-E1 type family	
AT1G60730	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily	
AT1G15415		
AT1G24909	Glutamine amidotransferase type 1 family	
AT1G72910	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein	
AT5G52670	Copper transport protein family	
AT1G07135	Glycine-rich protein	
AT1G25275		
AT4G36500		
AT1G72900	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein	
AT3G25250	Arabidopsis protein kinase (OXI1)	
AT4G14680	ATP sulfurylase (APS3)	
AT2G38860	protease like protein (YLS5)	
AT4G22690	CYTOCHROME P450, FAMILY 706, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1 (CYP706A1)	
AT5G05730	ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBUNIT 1 (ASA1)	
AT3G28930	AVRRPT2-INDUCED GENE 2 (AIG2)	
AT3G60140	DARK INDUCIBLE 2 (DIN2)	
AT5G22300	NITRILASE 4 (NIT4)	
AT2G41180	SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 2 (SIB2)	
AT1G23550	SIMILAR TO RCD ONE 2 (SRO2)	
AT3G54640	TRYPTOPHAN SYNTHASE ALPHA CHAIN (TSA1)	
AT3G53160	UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 73C7 (UGT73C7)	
AT2G15490	UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE 73B4 (UGT73B4)	
AT5G04340	ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA 6 (ZAT6)	

Tabelle 8.15 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 5.3 (aktivierte Gene durch ERF106, ERF107 und Verticillium-Infektion). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF106 und ERF107 mit einem Induktionswert $\geq 1,5$ ($p \leq 0,01$) sowie nach Infektion mit Verticillium longisporum (3dpi, $\log_2FC \geq 2,0$) aus (Iven et al, 2012) aktiviert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF106, ERF107 UND VERTICILLIUM-INFESTION
AT1G26380	FAD-binding Berberine family (FOX1)	
AT3G28580		
AT1G19020		
AT3G54150	methyltransferase superfamily	
AT4G08555		
AT2G41730		
AT3G16530	Lectin like protein	
AT3G28210	STRESS-ASSOCIATED PROTEIN 12 (SAP12); (PMZ)	
AT3G26200	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 22 (CYP71B22)	
AT5G57220	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY F, POLYPEPTIDE 2 (CYP81F2)	
AT3G16150	ASPARAGINASE B1 (ASPG1)	
AT5G20230	BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN (BCB)	
AT1G67980	CAFFEYOYL-COA 3-O-METHYLTRANSFERASE (CCOAMT)	
AT1G02930	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6 (GSTF6)	
AT1G02920	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 7 (GSTF7)	
AT4G02520	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 2 (GSTF2)	

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL AKTIVIERT DURCH ERF106, ERF107 UND VERTICILLIUM-INFEKTION
AT1G69920	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 12 (GSTU12)
AT2G29460	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4 (GSTU4)
AT3G23250	MYB DOMAIN PROTEIN 15 (MYB15)
AT2G43000	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 42 (NAC042)
AT4G08770	PEROXIDASE 37 (Prx37)
AT2G26560	PHOSPHOLIPASE A 2A (PLA2A)
AT3G26830	PHYTOALEXIN DEFICIENT 3 (PAD3)
AT1G27730	SALT TOLERANCE ZINC FINGER (STZ)
AT2G41100	TOUCH 3 (TCH3)

Tabelle 8.16 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 5.3 (aktivierte Gene durch ERF107 und Verticillium-Infektion). Differenziell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF107 mit einem Induktionswert $\geq 1,5$ ($p \leq 0,01$) sowie nach Infektion mit *Verticillium longisporum* (3dpi, $\log_2FC \geq 2,0$) aus (Iven et al, 2012) aktiviert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF107 UND VERTICILLIUM-INFEKTION
AT5G48430		
AT1G59860	HSP20-like chaperones superfamily	
AT2G18680		
AT5G39580	Peroxidase superfamily	
AT1G13520		
AT5G48540	receptor-like protein kinase-related family	
AT5G24640		
AT5G64120	Peroxidase superfamily	
AT1G53625		
AT1G13480		
AT1G26390	FAD-binding Berberine family	
AT1G30700	FAD-binding Berberine family	
AT2G18690		
AT1G26410	FAD-binding Berberine family	
AT5G39670	Calcium-binding EF-hand family	
AT2G43590	Chitinase family	
AT5G38900	Thioredoxin superfamily	
AT1G07400	HSP20-like chaperones superfamily	
AT2G29500	HSP20-like chaperones superfamily	
AT5G42830	acyl-transferase family	
AT1G26420	FAD-binding Berberine family	
AT2G38870		
AT1G65500		
AT3G18250	putative membrane lipoprotein	
AT4G10250	(ATHSP22.0)	
AT2G43570	CHITINASE, PUTATIVE (CHI)	
AT4G37370	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY D, POLYPEPTIDE 8 (CYP81D8)	
AT5G12020	17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN (HSP17.6II)	
AT1G77120	ALCOHOL DEHYDROGENASE 1 (ADH1)	
AT1G32350	ALTERNATIVE OXIDASE 1D (AOX1D)	
AT1G76650	CALMODULIN-LIKE 38 (CML38)	
AT2G30750	CYTOCHROME P450, FAMILY 71, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 12 (CYP71A12)	
AT2G04040	DETOXIFICATION 1 (DTX1)	
AT2G47520	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 71 (ERF71)	
AT5G25250	FLOTILLIN 1 (FLOT1)	
AT5G40990	GDSL LIPASE 1 (GLIP1)	
AT5G12030	HEAT SHOCK PROTEIN 17.6A (HSP17.6A)	
AT5G59720	HEAT SHOCK PROTEIN 18.2 (HSP18.2)	

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	AKTIVIERT DURCH ERF107 UND VERTICILLIUM-INFEKTION
AT2G26150	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A2 (HSFA2)	
AT4G25200	MITOCHONDRION-LOCALIZED SMALL HEAT SHOCK PROTEIN 23.6 (HSP23.6-MITO)	
AT1G14540	PEROXIDASE 4 (PER4)	
AT3G48850	PHOSPHATE TRANSPORTER 3;2 (PHT3;2)	
AT5G06860	POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN 1 (PGIP1)	
AT5G59820	RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41 (RHL41)	
AT1G05680	URIDINE DIPHOSPHATE GLYCOSYLTRANSFERASE 74E2 (UGT74E2)	
AT4G14365	XB3 ORTHOLOG 4 IN ARABIDOPSIS THALIANA (XBAT34)	

Tabelle 8.17 Schnittmenge des Venn-Diagramms aus Abbildung 5.3 (inhibierte Gene durch ERF106 und Verticillium-Infektion). Differentiell exprimierte Gene, die nach Überexpression von ERF106 mit einem Induktionswert $\geq 1,5$ ($p \leq 0,01$) sowie nach Infektion mit *Verticillium longisporum* (3dpi, $\log_2FC \geq 2,0$) aus (Iven et al, 2012) inhibiert wurden.

AT-NUMMER	PRIMARY GENE SYMBOL	INHIBIERT DURCH ERF106 UND VERTICILLIUM-INFEKTION
AT3G15670	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein	
AT5G46890		
AT5G04960	invertase / pectin methylesterase inhibitor superfamily	
AT1G14960	Polyketide cyclase / dehydrase and lipid transport superfamily protein	
AT5G42580	CYTOCHROME P450, FAMILY 705, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 12 (CYP705A12)	

Tabelle 8.18 Bindestellen-Analyse von ERF106 und ERF107 sowie der putativen Ziel-Gene aus den Transkriptom-Analysen nach AGRIS und AthaMap (Davuluri *et al*, 2003; Galuschka *et al*, 2007; Bülow *et al*, 2009, 2010). Gesucht wurde nach Bindestellen für ERF-Transkriptionsfaktoren.

At-Nr.	Gen	AGRIS	ATHAMAP
At5g07580	ERF106		✓
At5g61590	ERF107		✓
At5g61600	ERF104		✓
At5g51190	ERF105		✓
At3g49620	DIN11		✓
At1g06160	ORA59	✓	
At5g44420	PDF1.2		✓
At2g26020	PDF1.2b		
At5g44430	PDF1.2c		
At2g26010	PDF1.3		✓
At3g56970	bHLH038		
At3g56980	bHLH039		
At2g41240	bHLH100		
At5g04150	bHLH101		✓
At1g01580	FRO2		
At4g19690	IRT1		
At3g51770	ETO1		✓
At5g03730	CTR1		✓
At5g05730	ASA1		
At5g17990	PAT1		
At4g39950	CYP79B2		✓
At2g22330	CYP79B3		✓
At4g31500	CYP83B1		✓
At5g57220	CYP81F2		
At2g30750	CYP71A12		
At2g30770	CYP71A13		✓
At1g02930	GSTF6	✓	✓
At3g26830	PAD3		
At2g33380	RD20	✓	
At2g43000	NAC042		✓
At3g23250	MYB15		✓
At4g01250	WRKY22		✓

9 Literaturverzeichnis

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M & Shinozaki K (2003) Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *Society* **15**: 63–78
- Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X & Zhu JK (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* **281**: 37636–37645
- Aharoni A, Dixit S, Jetter R, Thoenes E, van Arkel G & Pereira A (2004) The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2463–2480
- Almérás E, Stolz S, Vollenweider S, Reymond P, Mène-Saffrané L & Farmer EE (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis. *Plant J.* **34**: 205–216
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer A a., Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402
- Andreou A, Brodhun F & Feussner I (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* **48**: 148–70
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM & Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977–983
- Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voeselek L a CJ & van Dongen JT (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends Plant Sci.* **17**: 129–38
- Bailey-Serres J & Voeselek L a CJ (2015) Flood adaptive traits and processes : an overview. *New Phytol.:* 57–73
- Balbi V & Devoto A (2008) Jasmonate signalling network in Arabidopsis thaliana: Crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* **177**: 301–318
- Bannenberg G, Martínez M, Hamberg M & Castresana C (2009a) Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of Arabidopsis thaliana. *Lipids* **44**: 85–95
- Bannenberg G, Martínez M, Rodríguez MJ, López MA, Ponce de León I, Hamberg M & Castresana C (2009b) Functional analysis of alpha-DOX2, an active alpha-dioxygenase critical for normal development in tomato plants. *Plant Physiol.* **151**: 1421–32
- Banno H, Ikeda Y, Niu QW & Chua NH (2001) Overexpression of Arabidopsis ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* **13**: 2609–2618
- Bauer P, Ling HQ & Gueriot M Lou (2007) FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 260–261
- Bednarek P, Piślewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A & Schulze-Lefert P (2009) A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science (80-.).* **323**: 101–106

- Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I & Csiszár J (2015) Plant glutathione peroxidases : Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J. Plant Physiol.* **176**: 192–201
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2006) Biochemistry. 5th edition. In *Biochemistry textbook* p 1120.
- Bernard (1993) The F plasmid CcdB induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* **234**: 534–41
- Berrocal-Lobo M, Molina A & Solano R (2002) Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J.* **29**: 23–32
- Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R & Smith AM (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis. *Plant J.* **49**: 810–828
- Blée E, Boachon B, Burcklen M, Le Guédard M, Hanano A, Heintz D, Ehlting J, Herrfurth C, Feussner I & Bessoule J-J (2014) The Reductase Activity of the Arabidopsis Caleosin RESPONSIVE TO DESSICATION20 Mediates Gibberellin-Dependent Flowering Time, Abscisic Acid Sensitivity, and Tolerance to Oxidative Stress. *Plant Physiol.* **166**: 109–24
- Boller T & Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406
- Bombardieri S, Cattani P, Ciabattini G, Di Munno O, Pasero G, Patrono C, Pinca E & Pugliese F (1981) The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Br. J. Pharmacol.* **73**: 893–901
- Böttcher C & Pollmann S (2009) Plant oxylipins: plant responses to 12-oxo-phytodienoic acid are governed by its specific structural and functional properties. *FEBS J.* **276**: 4693–704
- Böttcher C, Westphal L, Schmotz C, Prade E, Scheel D & Glawischnig E (2009) The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **21**: 1830–1845
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, Bush J, Cheng S & Sheen J (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. **464**: 418–422
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C-M, van Lammeren A a M, Miki BL a, Custers JBM & van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**: 1737–1749
- Bowles D, Isayenkova J & Lim E (2005) Glycosyltransferases : managers of small molecules.
- Boyington JC, Gaffney BJ & Amzel LM (1993) The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **260**: 1482–1486
- Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang C-Z & Riechmann JL (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 4706–4711
- Brown RL, Kazan K, Mcgrath KC, Maclean DJ, Manners JM & Plant T (2003) A Role for the GCC-Box in

- Jasmonate-Mediated Activation of the PDF1 . 2 Gene of Arabidopsis 1. *Society* **132**: 1020–1032
- Browse J & Howe G a (2008) New weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol.* **146**: 832–838
- Buczynski MW, Dumlao DS & Dennis E a (2009) Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J. Lipid Res.* **50**: 1015–1038
- Bülow L, Brill Y & Hehl R (2010) AthaMap-assisted transcription factor target gene identification in *Arabidopsis thaliana*. *Database* **2010**: baq034
- Bülow L, Engelmann S, Schindler M & Hehl R (2009) AthaMap, integrating transcriptional and post-transcriptional data. *Nucleic Acids Res.* **37**: 983–986
- Chauvin A, Caldelari D, Wolfender J-L & Farmer EE (2013) Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytol.* **197**: 566–75
- Chen W & Singh KB (1999) The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J.* **19**: 667–677
- Chen X-Y & Kim J-Y (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signal. Behav.* **4**: 489–492
- Chico JM, Chini A, Fonseca S & Solano R (2008) JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 486–494
- Chini a, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL & Solano R (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666–671
- Christianson J a, Wilson IW, Llewellyn DJ & Dennis ES (2009) The low-oxygen-induced NAC domain transcription factor ANAC102 affects viability of *Arabidopsis* seeds following low-oxygen treatment. *Plant Physiol.* **149**: 1724–1738
- Chung HS, Koo AJK, Gao X, Jayanty S, Thines B, Jones a D & Howe G a (2008) Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* **146**: 952–964
- Clarke DB (2010) Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal. Methods* **2**: 310
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G & Ausubel FM (2009) Glucosinolate Metabolites Required for an *Arabidopsis* Innate Immune Response. *Science (80-.).* **323**: 95–101
- Clough SJ & Bent a F (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–43
- Colangelo EP & Guerinot M Lou (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400–3412
- Cole DJ (1994) Detoxification and Activation of Agrochemicals in Plants*. : 209–222
- Dave A, Hernández ML, He Z, Andriotis VME, Vaistij FE, Larson TR & Graham I a (2011) 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in

- Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 583–99
- Davuluri R V, Sun H, Palaniswamy SK, Matthews N, Molina C, Kurtz M & Grotewold E (2003) AGRIS : Arabidopsis Gene Regulatory Information Server , an transcription factors. *BMC Bioinformatics* **4**: 1–11
- Delker C, Stenzel I, Hause B, Miersch O, Feussner I & Wasternack C (2006) Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana--enzymes, products, regulation. *Plant Biol. (Stuttg)*. **8**: 297–306
- Denison MS & Whitlock JP (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* **270**: 18175–18178
- Depicker A & Van Montagu M (1997) Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 373–382
- Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D & Fobert PR (2003) The Arabidopsis NPR1 Disease Resistance Protein Is a Novel Cofactor That Confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the Basic Domain / Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181–2191
- Després C, DeLong C, Glaze S, Liu E & Fobert PR (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279–290
- Dietrich K, Weltmeier F, Ehlert A, Weiste C, Stahl M, Harter K & Dröge-Laser W (2011) Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell* **23**: 381–95
- Dixon DP, Skipsey M & Edwards R (2010) Phytochemistry Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **71**: 338–350
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ & Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Physiol.* **105**: 1075–1087
- Van Dongen JT, Fröhlich A, Ramírez-Aguilar SJ, Schauer N, Fernie AR, Erban A, Kopka J, Clark J, Langer A & Geigenberger P (2009) Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. *Ann. Bot.* **103**: 269–280
- Ehlert A, Weltmeier F, Wang X, Mayer CS, Smeekens S, Vicente-Carbajosa J & 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**: 890–900
- Elliott RC, Betzner a S, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQ, Gerentes D, Perez P & Smyth DR (1996) AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**: 155–168
- Ellis C, Karafyllidis I & Turner JG (2002) Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**: 1025–1030
- Ellis MH, Dennis ES & Peacock WJ (1999) Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol.* **119**: 57–64

- Erdal S & Dumlupinar R (2010) Progesterone and β -Estradiol stimulate seed germination in chickpea by causing important changes in biochemical parameters. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **65**: 239–244
- Euler US von (1936) On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (Prostaglandin and Vesiglandin).
- Eulgem T (2005) Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* **10**: 71–78
- Falk KL, Kästner J, Bodenhausen N, Schramm K, Paetz C, Vassão DG, Reichelt M, Von Knorre D, Bergelson J, Erb M, Gershenzon J & Meldau S (2014) The role of glucosinolates and the jasmonic acid pathway in resistance of Arabidopsis thaliana against molluscan herbivores. *Mol. Ecol.* **23**: 1188–1203
- Fan W & Dong X (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 1377–1389
- Farmer EE & Davoine C (2007) Reactive electrophile species. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 380–6
- Farmer EE & Dubugnon L (2009) Detritivorous crustaceans become herbivores on jasmonate-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 935–940
- Farmer EE & Mueller MJ (2013) ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 429–450
- Farmer EE & Ryan C a (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 7713–7716
- Fels AOS, Pawlowski NA, Abraham EL & Cohn ZA (1986) Compartmentalized regulation of macrophage arachidonic acid metabolism. **163**: 752–757
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico J-M, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L, Witters E, Puga MI, Paz-Ares J, Goossens A, Reymond P, De Jaeger G & Solano R (2011) The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701–715
- Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM & Dewdney J (2007) Resistance to Botrytis cinerea induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol.* **144**: 367–379
- Ferreira SH (1972) Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and Analgesia. *Nat. New Biol.* **240**: 200–203
- Feussner I & Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 275–97
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN & Turner JG (1994) Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**: 751–759
- van der Fits L & Memelink J (2000) ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**: 295–297
- Fode B, Siemsen T, Thurow C, Weigel R & Gatz C (2008) The Arabidopsis GRAS protein SCL14 interacts

- with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *Plant Cell* **20**: 3122–35
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C & Solano R (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 344–350
- Fragoso V, Rothe E, Baldwin IT & Kim SG (2014) Root jasmonic acid synthesis and perception regulate folivore-induced shoot metabolites and increase *Nicotiana attenuata* resistance. *New Phytol.*: 1335–1345
- Frerigmann H & Gigolashvili T (2014) MYB34, MYB51, and MYB122 Distinctly Regulate Indolic Glucosinolate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **7**: 814–28
- Fufezan C, Rutherford a. W & Krieger-Liszka A (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Lett.* **532**: 407–410
- Fujiki Y, Yoshikawa Y, Sato T, Inada N, Ito M, Nishida I & Watanabe A (2001) Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. : 345–352
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui a, Shinshi H & Ohme-Takagi M (2000) *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**: 393–404
- Fukao T & Bailey-Serres J (2008) Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 16814–16819
- Fukao T, Xu K, Ronald PC & Bailey-Serres J (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* **18**: 2021–2034
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871–1875
- Funk MO, Carrol RT, Thompson JF, Sands RH & Dunham WR (1990) Role of iron in lipoxygenase catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 5375–5376
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Mittler R, Breusegem F Van, Shulaev V, Apel K & Inze D (2006) Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in *Arabidopsis* 1 [W]. *Plant Physiol.* **141**: 436–445
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H & Ryals J (1993) Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science (80-.)*. **261**: 754–756
- Galuschka C, Schindler M, Bülow L & Hehl R (2007) AthaMap web tools for the analysis and identification of co-regulated genes. *Nucleic Acids Res.* **35**: 21–24
- García MJ, García-Mateo MJ, Lucena C, Romera FJ, Rojas CL, Alcántara E & Pérez-Vicente R (2014) Hypoxia and bicarbonate could limit the expression of iron acquisition genes in Strategy I plants

- by affecting ethylene synthesis and signaling in different ways. *Physiol. Plant.* **150**: 95–106
- García MJ, Lucena C, Romera FJ, Alcántara E & Pérez-Vicente R (2010) Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **61**: 3885–3899
- Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J & Holdsworth MJ (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**: 415–8
- Girotti AW (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* **39**: 1529–1542
- Giuntoli B, Lee SC, Licausi F, Kosmacz M, Oosumi T, van Dongen JT, Bailey-Serres J & Perata P (2014) A Trihelix DNA Binding Protein Counterbalances Hypoxia-Responsive Transcriptional Activation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* **12**: e1001950
- Glauser G, Grata E, Dubugnon L, Rudaz S, Farmer EE & Wolfender JL (2008) Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding. *J. Biol. Chem.* **283**: 16400–16407
- Glawischnig E (2007) Camalexin. *Phytochemistry* **68**: 401–6
- van der Graaff E, Dulk-Ras a D, Hooykaas PJ & Keller B (2000) Activation tagging of the LEAFY PETIOLE gene affects leaf petiole development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**: 4971–4980
- Grebner W, Stingl NE, Oenel A, Mueller MJ & Berger S (2013) Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **161**: 2159–70
- Grubb CD & Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci.* **11**: 89–100
- Guengerich FP (1991) Reactions and Significance of Cytochrome P-450 Enzymes. **266**: 10019–10022
- Guo A, He K, Liu D, Bai S, Gu X, Wei L & Luo J (2005) DATF: A database of *Arabidopsis* transcription factors. *Bioinformatics* **21**: 2568–2569
- Guo H & Ecker JR (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCFEBF1/EBF2- dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**: 667–677
- Gutterson N & Reuber TL (2004) Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 465–471
- Haeggström JZ & Funk CD (2011) Lipoxygenase and leukotriene pathways: Biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem. Rev.* **111**: 5866–5896
- Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez MJ & Castresana C (2005) Alpha-dioxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**: 169–74
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–80

- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MMWB & 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**: 935–49
- Hanssen M (2009) Sweet connections, bZIP transcription factors and the regulation of metabolism in Arabidopsis. *Dissertation*
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H & Ashikari M (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**: 1026–1030
- Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES, Sauter M & Dolferus R (2010) Arabidopsis RAP2.2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol.* **153**: 757–772
- Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ & Dennis ES (1998) Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* **149**: 479–490
- Hou B, Lim E, Higgins GS & Bowles DJ (2004) N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of. **279**: 47822–47832
- Howe G a & Schillmiller AL (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 230–6
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W & Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics* **2008**: 420747
- Hsu F-C, Chou M-Y, Chou S-J, Li Y-R, Peng H-P & Shih M-C (2013) Submergence Confers Immunity Mediated by the WRKY22 Transcription Factor in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 2699–713
- Hsu FC, Chou MY, Peng HP, Chou SJ & Shih MC (2011) Insights into hypoxic systemic responses based on analyses of transcriptional regulation in arabidopsis. *PLoS One* **6**: 14–16
- Huang Y, Li H, Hutchison CE, Laskey J & Kieber JJ (2003) Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant J.* **33**: 221–233
- Hwang IS & Hwang BK (2010) The pepper 9-lipoxygenase gene CaLOX1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol.* **152**: 948–67
- Hyde C a C & Missailidis S (2009) Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **9**: 701–15
- Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A & Shinozaki K (2005) RARTF: Database and tools for complete sets of Arabidopsis transcription factors. *DNA Res.* **12**: 247–256
- Iven T, König S, Singh S, Braus-Stromeyer S a., Bischoff M, Tietze LF, Braus GH, Lipka V, Feussner I & Dröge-Laser W (2012) Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in arabidopsis roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen verticillium longisporum. *Mol. Plant* **5**: 1389–1402

- Iven TE (2009) Transkriptomanalyse der Arabidopsis-Wurzel nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Verticillium longisporum* und Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O & Thomashow MF (1998) Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104–106
- Jakoby M, Wang HY, Reidt W, Weisshaar B & Bauer P (2004) FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **577**: 528–534
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T & Parcy F (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **7**: 106–111
- Johnson C, Glover G & Arias J (2001) Regulation of DNA binding and trans-activation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor. *J. Biol. Chem.* **276**: 172–178
- Kang J, Hwang J-U, Lee M, Kim Y-Y, Assmann SM, Martinoia E & Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 2355–60
- Kang J-H, Wang L, Giri A & Baldwin IT (2006) Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *Plant Cell* **18**: 3303–3320
- Katsir L, Schillmiller AL, Staswick PE, He SY & Howe G a (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 7100–7105
- Kazan K & Manners JM (2013) MYC2: The master in action. *Mol. Plant* **6**: 686–703
- Kim JH & Jander G (2007) *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on Arabidopsis induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant J.* **49**: 1008–1019
- Kim JH, Lee BW, Schroeder FC & Jander G (2008) Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J.* **54**: 1015–1026
- Kliebenstein DJ, Rowe HC & Denby KJ (2005) Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: Variation in host production and pathogen sensitivity. *Plant J.* **44**: 25–36
- Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R & Dennis ES (2002) Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures. *Plant Cell* **14**: 2481–2494
- Koncz C & Schell J (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Genet. Genomics (Historical Arch.)* **204**: 383–396
- Koo AJK & Howe G a (2009) The wound hormone jasmonate. **70**: 1571–1580
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC & Pieterse CMJ (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox

- modulation. *Plant Physiol.* **147**: 1358–1368
- Köster J, Thurow C, Kruse K, Meier A, Iven T, Feussner I & Gatz C (2012) Xenobiotic- and jasmonic acid-inducible signal transduction pathways have become interdependent at the Arabidopsis CYP81D11 promoter. *Plant Physiol.* **159**: 391–402
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G & Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 2940–2945
- Krauss G (2001) Biochemistry of Signal Transduction and Regulation
- Kreuzwieser J, Hauberg J, Howell K a, Carroll A, Rennenberg H, Millar a H & Whelan J (2009) Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. *Plant Physiol.* **149**: 461–473
- Kubo M, Imai A, Nishiyama T, Ishikawa M, Sato Y, Kurata T, Hiwatashi Y, Reski R & Hasebe M (2013) System for Stable β -Estradiol-Inducible Gene Expression in the Moss *Physcomitrella patens*. *PLoS One* **8**: 1–13
- Kürsteiner O, Dupuis I & Kuhlemeier C (2003) The pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiol.* **132**: 968–978
- Kyhse-Andersen J (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: simple and efficient method for immunoblotting. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203–9
- Labrou NE, Papageorgiou AC, Pavli O & Fliemetakis E (2015) Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**: 186–194
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–5
- Langmead B & Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**: 357–359
- Lasanthi-Kudahettige R, Magneschi L, Loreti E, Gonzali S, Licausi F, Novi G, Beretta O, Vitulli F, Alpi A & Perata P (2007) Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. *Plant Physiol.* **144**: 218–231
- Lawrence M, Gentleman R & Carey V (2009) rtracklayer: an R package for interfacing with genome browsers. *Bioinformatics* **25**: 1841–1842
- Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R & Carey VJ (2013) Software for computing and annotating genomic ranges. *Plos Comput. Biol.* **9**:
- Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J & Ward E (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J.* **16**: 223–233
- Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M & Stacey G (2007) Identification of 118 Arabidopsis transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**: 900–911
- Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P & Perata P (2010) HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in

- Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **62**: 302–15
- Licausi F, Kosmacz M, Weits D a, Giuntoli B, Giorgi FM, Voeselek L a CJ, Perata P & van Dongen JT (2011) SUPPLEMENTALS Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. SUPPLEMENTALS. *Nature* **479**: 419–22
- Licausi F & Perata P (2009) Low oxygen signaling and tolerance in plants. *Adv. Bot. Res. Vol 50* **50**: 139–198
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D & Durner J (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *Plant Cell* **22**: 2894–2907
- Liu F, Vantoai T, Moy LP, Bock G, Linford LD & Quackenbush J (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **137**: 1115–1129
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K & 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**: 1391–1406
- Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J & Mueller MJ (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol.* **137**: 328–340
- Loll PJ, Picot D & Garavito RM (1995) The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 637–643
- López M a., Vicente J, Kulasekaran S, Velloso T, Martínez M, Irigoyen ML, Cascón T, Bannenber G, Hamberg M & Castresana C (2011) Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant J.* **67**: 447–458
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ & Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178
- Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A & Perata P (2005) A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis seedlings under anoxia. *Plant Physiol.* **137**: 1130–1138
- Mafli A, Goudet J & Farmer EE (2012) Plants and tortoises: Mutations in the Arabidopsis jasmonate pathway increase feeding in a vertebrate herbivore. *Mol. Ecol.* **21**: 2534–2541
- Marrs K a. (1996) the Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 127–158
- Martinoia E, Maeshima M & Neuhaus HE (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **58**: 83–102
- Massey K a. & Nicolaou A (2013) Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* **59**: 45–55

- Matthes MC, Bruce TJ a, Ton J, Verrier PJ, Pickett J a & Napier J a (2010) The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. *Planta* **232**: 1163–80
- Maurer F, Müller S & Bauer P (2011) Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 530–6
- Maurer F, Naranjo Arcos MA & Bauer P (2014) Responses of a triple mutant defective in three iron deficiency-induced BASIC HELIX-LOOP-HELIX genes of the subgroup Ib(2) to iron deficiency and salicylic acid. *PLoS One* **9**:
- McConn M, Creelman R a, Bell E, Mullet JE & Browse J (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 5473–5477
- McKinnon R a, Sorich MJ & Ward MB (2008) McKinnon (2008) Cytochrome P450 Part 1 Multiplicity and Function.pdf. *J. Pharm. Pract. Res.* **38**: 55–57
- Melnikova I (2010) Pain market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**: 589–590
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe G a. & He SY (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J.* **55**: 979–988
- Mitsuda N & Ohme-Takagi M (2009) Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1232–1248
- Miyata N & Roman RJ (2005) Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in vascular system. *J. Smooth Muscle Res.* **41**: 175–193
- Montillet J-L, Cacas J-L, Garnier L, Montané M-H, Douki T, Bessoule J-J, Polkowska-Kowalczyk L, Maciejewska U, Agnel J-P, Vial A & Triantaphylidès C (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *Plant J.* **40**: 439–51
- Mosblech A, Feussner I & Heilmann I (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem.* **47**: 511–7
- Mou Z, Fan W & Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance Regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935–944
- Mousavi S a R, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S & Farmer EE (2013) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* **500**: 422–6
- Mueller MJ (2004) Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 441–8
- Mueller MJ & Berger S (2009) Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* **70**: 1511–21
- Mueller MJ, Mène-Saffrané L, Grun C, Karg K & Farmer EE (2006) Oxylipin analysis methods. *Plant J.* **45**: 472–89
- Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Kruschke M, Mueller MJ & Berger S (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription

- factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 768–85
- Müller R, de Vos M, Sun JY, Sønderby IE, Halkier B a., Wittstock U & Jander G (2010) Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores. *J. Chem. Ecol.* **36**: 905–913
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T & Shinshi H (2006) Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol.* **140**: 411–432
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F & Conclusions VI (1999) Prostanoid Receptors : Structures , Properties , and Functions. **79**: 1193–1226
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Aubrey R & Lefkowitz JB (1986) Arachidonic acid metabolism! 2. : 69–102
- Nguyen T, Nioi P & Pickett CB (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**: 13291–5
- Nobels I, Spanoghe P, Haesaert G, Robbens J & Blust R (2011) Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *PLoS One* **6**:
- Oates J (1982) The 1982 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science* **218**: 765–768
- Ogawa T, Pan L, Kawai-Yamada M, Yu L-H, Yamamura S, Koyama T, Kitajima S, Ohme-Takagi M, Sato F & Uchimiya H (2005) Functional Analysis of Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Protein Conferring Resistance to Bax. *Plant Physiol.* **138**: 1436–1445
- Ohki S, Ogino B, Yamamoto S & Hayaishi O (1979) Prostaglandin Hydroperoxidase, an Integral part of Prostaglandin Endoperoxidase Synthetase from Bovine Vesicular Gland Microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**: 829–836
- Ohme-Takagi M & Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**: 173–182
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H & Ohme-Takagi M (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**: 1959–1968
- Okuzaki A, Konagaya K, Nanasato Y, Tsuda M & Tabei Y (2011) Estrogen-inducible GFP expression patterns in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* **30**: 529–538
- Oñate-Sánchez L, Anderson JP, Young J & Singh KB (2007) AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiol.* **143**: 400–409
- Oñate-Sánchez L & Singh KB (2002) Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol.* **128**: 1313–1322
- Pabo CO & Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA

- recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1053–1095
- Papdi C, Ábrahám E, Joseph MP, Koncz C & Szabados L (2008) Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the Controlled cDNA Overexpression System. *Acta Biol. Szeged.* **52**: 45–48
- Parchmann S, Cundlach H & Mueller MJ (1997) Induction of 12-Oxo-Phytodienoic Acid in Wounded Plants and Elicited Plant Cell Cultures. **115**: 1057–1064
- Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R & Paek KH (2001) Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* **13**: 1035–1046
- Pascuzzi P, Hamilton D, Bodily K & Arias J (1998) Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *J. Biol. Chem.* **273**: 26631–26637
- Penninckx I a, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala a, Métraux JP, Manners JM & Broekaert WF (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309–2323
- Penninckx I a, Thomma BP, Buchala a, Métraux JP & Broekaert WF (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 2103–2113
- Pérez-Chacón G, Astudillo AM, Balgoma D, Balboa M a. & Balsinde J (2009) Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**: 1103–1113
- Picot D, Loll PJ & Garavito M (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**: 243–249
- Pistorius EK & Axelrod B (1974) Iron, an Essential Component of Lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* **249**: 3183–3186
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ & Memelink J (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**: 1347–1357
- Pucciariello C, Parlanti S, Banti V, Novi G & Perata P (2012) Reactive oxygen species-driven transcription in Arabidopsis under oxygen deprivation. *Plant Physiol.* **159**: 184–96
- Qu LJ & Zhu YX (2006) Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 544–549
- Queitsch C, Hong S-W, Vierling E & Lindquist S (2000) Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 479–492
- Raacke IC, Mueller MJ & Berger S (2006) Defects in allene oxide synthase and 12-oxa-phytodienoic acid reductase alter the resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* **154**: 740–744
- Rajniak J, Barco B, Clay NK & Sattely ES (2015) A new cyanogenic metabolite in Arabidopsis required

- for inducible pathogen defence. *Nature* **525**: 376–379
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I & Gouesbet G (2009) Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol.* **9**: 28
- Ramel F, Sulmon C, Serra A-A, Gouesbet G & Couée I (2012) Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *J. Exp. Bot.* **63**: 3999–4014
- Rancé I, Fournier J & Esquerré-Tugayé MT (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6554–6559
- Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I & Mueller-Roeber B (2007) PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics* **8**: 42
- Richman A, Swanson A, Humphrey T, Chapman R, Mcgarvey B, Pocs R & Brandle J (2005) Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. : 56–67
- Riechmann JL (2000) *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science (80-.)*. **290**: 2105–2110
- Robatzek S & Somssich IE (2001) A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* **28**: 123–133
- Robinson MD, McCarthy DJ & Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL & Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694–697
- Ross J, Li Y, Lim E & Bowles DJ (2001) Higher plant glycosyltransferases. : 1–6
- Rossi a, Elia G & Santoro MG (1997) Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 746–50
- Saga H, Ogawa T, Kai K, Suzuki H, Ogata Y, Sakurai N, Shibata D & Ohta D (2012) Identification and Characterization of ANAC042, a Transcription Factor Family Gene Involved in the Regulation of Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**: 684–696
- Samuelsson B (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**: 568–575
- Sander mann H (1987) Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen. Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus. *Naturwissenschaften* **74**: 573–578
- Sander mann H (1992) Plant metabolism of xenobiotics. : 7–9
- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW & Goldberg RB (2000) The *arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant*

- Cell* **12**: 1041–1061
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467
- Santi S & Schmidt W (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytol.* **183**: 1072–1084
- Santosa IE, Ram PC, Boamfa EI, Laarhoven LJJ, Reuss J, Jackson MB & Harren FJM (2007) Patterns of peroxidative ethane emission from submerged rice seedlings indicate that damage from reactive oxygen species takes place during submergence and is not necessarily a post-anoxic phenomenon. *Planta* **226**: 193–202
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-lundback M, Pollard M & Dellapenna D (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* **16**: 1419–1432
- Sattler SE, Mène-Saffrané L, Farmer EE, Krischke M, Mueller MJ & DellaPenna D (2006) Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in Arabidopsis tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell* **18**: 3706–3720
- Schäffer a a, Aravind L, Madden TL, Shavirin S, Spouge JL, Wolf YI, Koonin E V & Altschul SF (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2994–3005
- Schaller A & Stintzi A (2009) Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry* **70**: 1532–1538
- Schilmiller AL & Howe G a. (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 369–377
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Halkier BA & Glawischnig E (2006) CYP71B15 (PAD3) Catalyzes the Final Step in Camalexin Biosynthesis 1. **141**: 1248–1254
- Schweizer F, Fernández-Calvo P, Zander M, Diez-Diaz M, Fonseca S, Glauser G, Lewsey MG, Ecker JR, Solano R & Reymond P (2013) Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell* **25**: 3117–32
- Shahnejat-Bushehri S, Mueller-Roeber B & Balazadeh S (2012) Arabidopsis NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 affects thermomemory-associated genes and enhances heat stress tolerance in primed and unprimed conditions. *Plant Signal. Behav.* **7**: 1518–21
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu F-F, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA & Zheng N (2010) Jasmonate perception by inositol phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*: 400–405
- Simmons DL, Botting RM & Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **56**: 387–437
- Singh KB, Foley RC & Oñate-Sánchez L (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 430–436

- Sivitz AB, Hermand V, Curie C & Vert G (2012) Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway. *PLoS One* **7**: e44843
- Smyth DR (1997) Gene silencing: cosuppression at a distance. *Curr. Biol.* **7**: R793–R795
- Solano R, Stepanova A, Chao Q & Ecker JR (1998) Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* **12**: 3703–3714
- Staswick PE, Su W & Howell SH (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 6837–40
- Staswick PE & Tiryaki I (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117–2127
- Stintzi a, Weber H, Reymond P, Browse J & Farmer EE (2001) Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 12837–42
- Stockinger EJ, Gilmour SJ & Thomashow MF (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**: 1035–1040
- Stotz HU, Jikumaru Y, Shimada Y, Sasaki E, Stingl N, Mueller MJ & Kamiya Y (2011) Jasmonate-dependent and COI1-independent defense responses against sclerotinia sclerotiorum in arabidopsis thaliana: Auxin is part of COI1-independent defense signaling. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1941–1956
- Stotz HU, Mueller S, Zoeller M, Mueller MJ & Berger S (2013) TGA transcription factors and jasmonate-independent COI1 signalling regulate specific plant responses to reactive oxylipins. *J. Exp. Bot.*: 1–13
- Strassburg K, Huijbrechts AML, Kortekaas K a., Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A, Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, Van Duynhoven J, Kalkhoven E, Newman JW & Vreeken RJ (2012) Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: Application in cardiac surgery. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**: 1413–1426
- Subramaniam R, Desveaux D, Spickler C, Michnick SW & Brisson N (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* **19**: 769–772
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J & Dong X (2008) Plant Immunity requires conformational changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science*
- Taki N, Sasaki-sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A & Kobayashi K (2005) 12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in Arabidopsis 1 [w]. **139**: 1268–1283
- Teixeira MC, Duque P & Sá-Correia I (2007) Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends Biotechnol.* **25**: 363–370

- Thimann K V. (1938) Hormones and the analysis of growth. *Plant Physiol.* **22**: 107
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe G a & Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665
- Thoma I, Loeffler C, Sinha AK, Gupta M, Krischke M, Steffan B, Roitsch T & Mueller MJ (2003) Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* **34**: 363–375
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx I a, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP & Broekaert WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 15107–15111
- Triantaphylidès C & Havaux M (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.* **14**: 219–228
- Umate P (2011) Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Signal. Behav.* **6**: 335–338
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa a, Tanaka T, Yoshida N & Narumiya S (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* **395**: 281–284
- Vellosillo T, Aguilera V, Marcos R, Bartsch M, Vicente J, Cascón T, Hamberg M & Castresana C (2013) Defense Activated by 9-Lipoxygenase-Derived Oxylipins Requires Specific Mitochondrial Proteins. *Plant Physiol.* **161**: 617–627
- Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M & Castresana C (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**: 831–46
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot M Lou, Briat J-F & Curie C (2002) IRT1, an Arabidopsis Transporter essential for Iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223–1233
- Vicente J, Cascón T, Vicedo B, García-Agustín P, Hamberg M & Castresana C (2012) Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Mol. Plant* **5**: 914–28
- Vick B a & Zimmermann DC (1979) Distribution of a Fatty Acid cyclase enzyme system in plants. *Plant Physiol.* **64**: 203–205
- De Vleeschauwer D, Gheysen G & Höfte M (2013) Hormone defense networking in rice: Tales from a different world. *Trends Plant Sci.* **18**: 555–565
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat a & Farmer EE (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant J.* **24**: 467–76
- de Vos M, Kriksunov KL & Jander G (2008) Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates

- deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiol.* **146**: 916–926
- Wahli W & Michalik L (2012) PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**: 351–363
- Wang HY, Klatte M, Jakoby M, Bäumlein H, Weisshaar B & Bauer P (2007) Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **226**: 897–908
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F & Glazebrook J (2009) *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog.* **5**:
- Wang N, Cui Y, Liu Y, Fan H, Du J, Huang Z, Yuan Y, Wu H & Ling H-Q (2013) Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **6**: 503–13
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**: 681–97
- Wasternack C & Hause B (2013) Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **111**: 1021–1058
- Wasternack C & Kombrink E (2010) Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. **5**: 63–77
- Wehner N (2012) Etablierung und Anwendung molekularer Methoden zur Analyse des *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsfaktor-ORFeoms.
- Weiste C (2011) *Arabidopsis* basic leucine Zipper transcription factors function as quantitative modulators of auxin mediated transcription Dissertation.
- Weiste C & Dröge-Laser W (2014) The *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery.
- Weiste C, Iven T, Fischer U, Oñate-Sánchez L & Dröge-Laser W (2007) In planta ORFeome analysis by large-scale over-expression of GATEWAY-compatible cDNA clones: screening of ERF transcription factors involved in abiotic stress defense. *Plant J.* **52**: 382–90
- Weits D a, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten H-M, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, van Dongen JT & Licausi F (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat. Commun.* **5**: 3425
- Werck-reichhart D & Feyereisen R (2000) Protein family review Cytochromes P450 : a success story. : 1–9
- Whiteman NK, Groen SC, Chevasco D, Bear A, Gregory TR, Denoux C, Mammarella N, Frederick M & Pierce NE (2011) Mining the plant-herbivore interface with a leafmining *Drosophila* of *Arabidopsis*. *Mol. Ecol.* **20**: 995–1014
- Wu a., Allu a. D, Garapati P, Siddiqui H, Dortay H, Zanol M-I, Asensi-Fabado M a., Munne-Bosch S, Antonio C, Tohge T, Fernie a. R, Kaufmann K, Xue G-P, Mueller-Roeber B & Balazadeh S (2012)

- JUNGBRUNNEN1, a Reactive Oxygen Species-Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **24**: 482–506
- Wu L, Zhang Z, Zhang H, Wang X-C & Huang R (2008) Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol.* **148**: 1953–1963
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M & Turner JG (1998) COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094
- Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC & Mackill DJ (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705–708
- Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L & Farmer EE (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**: 2470–2483
- Yang C-Y, Hsu F-C, Li J-P, Wang N-N & Shih M-C (2011) The AP2/ERF transcription factor AtERF73/HRE1 modulates ethylene responses during hypoxia in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **156**: 202–12
- Yi SY, Shirasu K, Moon JS, Lee SG & Kwon SY (2014) The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PLoS One* **9**:
- Youm JW, Jeon JH, Choi D, Yi SY, Joung H & Kim HS (2008) Ectopic expression of pepper CaPF1 in potato enhances multiple stresses tolerance and delays initiation of in vitro tuberization. *Planta* **228**: 701–708
- Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D & Ling H-Q (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res.* **18**: 385–397
- Zander M, La Camera S, Lamotte O, Métraux JP & Gatz C (2010) Arabidopsis thaliana class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *Plant J.* **61**: 200–210
- Zander M, Chen S, Imkamp J, Thurow C & Gatz C (2012) Repression of the arabidopsis thaliana jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by tga-interacting glutaredoxins depends on their c-terminal alwl motif. *Mol. Plant* **5**: 831–840
- Zarei A, Körbes AP, Younessi P, Montiel G, Champion A & Memelink J (2011) Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **75**: 321–31
- Zhang Y, Fan W, Kinkema M, Li X & Dong X (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 6523–6528
- Zhao J & Last RL (1996) Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**: 2235–2244
- Zhou JM, Trifa Y, Silva H, Pontier D, Lam E, Shah J & Klessig DF (2000) NPR1 differentially interacts

with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**: 191–202

Zhurov V, Navarro M, Bruinsma K a., Arbona V, Santamaria ME, Cazaux M, Wybouw N, Osborne EJ, Ens C, Rioja C, Vermeirssen V, Rubio-Somoza I, Krishna P, Diaz I, Schmid M, Gomez-Cadenas A, Van de Peer Y, Grbic M, Clark RM, Van Leeuwen T, et al (2014) Reciprocal Responses in the Interaction between Arabidopsis and the Cell-Content-Feeding Chelicerate Herbivore Spider Mite. *Plant Physiol.* **164**: 384–399

Zivkovic AM, Yang J, Georgi K, Hegedus C, Nording ML, O’Sullivan A, German JB, Hogg RJ, Weiss RH, Bay C & Hammock BD (2012) Serum oxylipin profiles in IgA nephropathy patients reflect kidney functional alterations. *Metabolomics* **8**: 1102–1113

Zuo J, Niu QW & Chua NH (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* **24**: 265–73

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
18:2	Linolsäure
18:3	Linolensäure
35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus 35S</i> Promotor
4-OH-ICN	4-Hydroxy-indol-3-carbonylnitril
4MI3A	4-Methoxyindol-3-ylmethylamin
4MI3G	4-Methoxyindol-3-ylmethylglukosinolat
A.t.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AA	Arachidonsäure
ACBP	Acyl-CoA-Binding Protein
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
AtTORF-Ex	<i>Arabidopsis thaliana</i> Transkriptionsfaktor ORF Überexpression
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i> Transkriptionsfaktor
bZIP	basischer Leucin-Zipper, Transkriptionsfaktor
CBF1	CRT/DRE-binding factor 1
cDNA	komplementär DNA
COI1	<i>CORONATINE INSENSITIVE 1</i>
Col-0	Columbia-0
COX	Cyclooxygenase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTR1	<i>constitutive ethylene response 1</i>
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
Cys	Cystein
DEG	differentiell exprimierte Gene
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGLA	Dihomogammalinolensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DOX	Dioxygenase
dpi	<i>days post infection</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Eikosapentaensäure
ERF	<i>ethylene responsive factor</i> , Transkriptionsfaktor
et al.	und andere
ETO1	<i>ethylene overproducer 1</i>

EtOH	Ethanol
FRK1	FLAGELLIN22-INDUCED RECEPTOR LIKE KINASE 1
FRO2	FERRIC REDUCTION OXIDASE 2
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
H₂O	Wasser
HA	kurze Aminosäuresequenz des Hämagglutinins zur Detektion im Western Blot
HCl	Salzsäure
HETE	Hydroxyeikosatetraensäure
HOD	Hydroxyoktadekadiensäure
HOT	Hydroxy-Oktadekatriensäure, Hydroxyfettsäure
hpi	<i>hours post infection</i>
HPOT	Hydroperoxyoktadekatriensäure
HRA1	HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR 1
HRE	HYPOXIA RESPONSIVE
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hyg	Hygromycin
I3A	Indol-3-ylmethylamin
I3G	Indol-3-ylmethylglukosinolat
IAN	Indol-3-Acetonitril
IAOx	Indol-3-Acetaldoxim
ICN	Indol-3-carbonylnitril
IRT1	IRON-REGULATED TRANSPORTER 1
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
JATI	<i>jasmonic acid triggered immunity</i>
JAZ	JASMONATE ZIM DOMAIN
Kan	Kanamycin
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KO	Knockout, Verlust-Mutante, <i>loss-of-function</i> -Mutante
KOD	Keto-Oktadekadiensäure, Ketofettsäure
KOT	Keto-Oktadekatriensäure, Ketofettsäure
LB	Luria-Bertani Broth
Log₂FC	Logarithmus log ₂ der Veränderung (<i>fold change</i>)
LOX	Lipoxygenase
LSD	<i>least significant difference</i>
M	Molar
M	Molar
Met	Methionin
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
MS	Murashige und Skoog
MW	Mittelwert
MYB	Transkriptionsfaktor der Myeloblastosis-Familie

NAA	1-Naphthalenessigsäure
NAC	NAM, ATAF1/2 und CUC2, Transkriptionsfaktor-Familie
NERP	N-end rule pathway
noxy	<i>non responding to oxylipin</i>
Nrf2	nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
NSAIDs	<i>non steroidal anti-inflammatory drugs</i>
OD	optische Dichte
Oex	Überexpression
OPDA	12-Oxophytodiensäure
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p	Signifikanzschwelle
PAD3	<i>Phytoalexin Deficient 3</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCA	principal component analysis / Hauptkomponentenanalyse
PCO	PLANT CYSTEIN OXIDASE
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	PYRUVAT DECARBOXYLASE
PGG2	Prostaglandin G2
PR	<i>pathogenesis related</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae pathovar tomato</i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
RA	Raphanusamic Acid
Rap2	RELATED TO AP2
RES	reaktive elektrophile Spezies
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler, <i>standard error</i>
sec	Sekunden
STABW	Standardabweichung
Sub1A	SUBMERGENCE 1A
T	Tween
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Puffer-Saline
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamidin
TF	Transkriptionsfaktor
TGA	<i>TGACG-motif binding factor</i>
TIBA	Trijodbenzoesäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan

Tsi	<i>TOBACCO STRESS-INDUCED GENE 1</i>
U	Enzymaktivität in <i>units</i>
ü.N.	über Nacht
UBQ5	Ubiquitin 5
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Massenverhältnis
WRKY	WRKY-Box Element-bindend, Transkriptionsfaktor
WT	Wildtyp
XVE	β-Estradiol induzierbares Expressionssystem
α	anti

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Arbeit fachlich oder persönlich unterstützt haben:

- bei Prof. Dr. Wolfgang Dröge-Laser für die zuverlässige Betreuung meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen zu dem interessanten Thema.
- bei PD Dr. Dirk Becker für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.
- beim Graduiertenkolleg GK1342 für die Seminare und Tagungen.
- bei der Frauenförderung der Universität Würzburg für das Stipendium vom „Programm Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ für die finanzielle Unterstützung im letzten Forschungsjahr.
- bei den Kollegen im Julius-von-Sachs-Institut:
 - Dr. Christoph Weiste für die große Hilfe im Labor bei Problemen aller Art (du weißt ja, ohne dich wäre das Labor aufgeschmissen!)
 - Mille grazie Dr. Lorenzo Pedrotti for the best mood in the lab and your never ending energy and passion for your work, which was sometimes quite infective ;-)
 - Wiebke und Susi für die schönen (Mittags-) Pausen im botanischen Garten
 - Christian, Jasmin (schöne Grüße nach London ☺), Jörn, Laura, Sarah (in alphabetischer Reihenfolge!)
 - Ayla und Miriam für ihre wunderbar ansteckende gute Laune und die positive Art ☺
 - Markus Krischke und Agnes Fekete für die Hilfe bei vielen (analytischen) Fragen
 - den Jungs aus der Werkstatt für die stets schnelle und zuverlässige Hilfe
- bei Alice und Christian für die wunderbare Freundschaft ☺
- bei meiner Familie!
- bei meinem wunderbaren Mann!

Danke!!!

Erklärung der Selbstständigkeit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den _____

(Elisabeth Walper)

