

**Untersuchungen zur Anpassung an Hypoxie in
Oryza sativa (L.) und *Arabidopsis thaliana* (L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Manuela Christina Hinz
aus Hannover

Kiel, Mai 2008

Referentin: Prof. Dr. M. Sauter

Korreferent: Prof. Dr. D. Ober

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Anpassungen von Reis (<i>Oryza sativa</i> L.) und <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) an Sauerstoffmangel	1
1.2 Wahrnehmung von Sauerstoffmangel in Pflanzen und anderen Organismen.....	7
1.3 Die Rolle von Ethylen bei der Anpassung an Hypoxie	9
1.3.1 Ethylenbiosynthese.....	10
1.3.2 Ethylensignaltransduktion	11
1.3.3 Interaktion von Ethylen und Sauerstoffmangel	13
1.3.4 AP2/ERF Proteine.....	16
1.4 Proteomanalysen.....	18
1.5 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Enzyme	23
2.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien	24
2.1.4 Pflanzenmaterial	24
2.1.5 Bakterienstämme und Vektoren.....	25
2.1.6 Synthetische Oligonukleotide.....	25
2.2 Pflanzenanzucht	26
2.2.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.)	26
2.2.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Wurzelkulturen	27
2.2.3 Anzucht von <i>Oryza sativa</i> (L.).....	27
2.3 Stressbehandlungen von <i>Arabidopsis</i> und Reis	28
2.3.1 Sauerstoffmangelversuche an <i>Arabidopsis</i>	28
2.3.2 Ethylen- und Ethyleninhibitorbehandlungen an <i>Arabidopsis</i>	28
2.3.3 Partielle Überflutung von Tiefwasserreis	28
2.4 Wachstumsversuche an <i>Arabidopsis</i> keimlingen	29
2.5 Ethylenmessungen über Gaschromatographie (GC).....	29
2.6 Anzucht von Bakterienstämmen	30
2.7 Molekularbiologische Methoden	30
2.7.1 Isolierung von DNA	30

2.7.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Arabidopsis.....	31
2.7.3	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	31
2.7.4	DNA-Sequenzierungen	31
2.7.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.7.6	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	32
2.7.7	DNA-Gelelektrophorese.....	32
2.7.8	Herstellung von transgenen Pflanzen	32
2.7.9	Herstellung von kompetenten Zellen	33
2.7.10	Transformation von Bakterien.....	34
2.7.11	Transformation von Arabidopsis	35
2.8	Expressionsanalysen.....	35
2.8.1	Promotor-GUS Expressionsanalysen	35
2.8.2	Northern-Blot-Analyse.....	35
2.9	Methoden zur Proteinanalyse.....	38
2.9.1	Aufreinigung von löslichen Gesamtproteinen für die 2D-Gelelektrophorese ..	38
2.9.2	Aufreinigung von löslichen Gesamtproteinen für die 2D-High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	38
2.9.3	Aufreinigung von Kernproteinen	39
2.9.4	Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	39
2.9.5	Bestimmung der Alkoholdehydrogenase (ADH) Enzymaktivität	40
2.9.6	Auftrennung von Proteinen über 2D-HPLC.....	40
2.9.7	Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE	41
2.9.8	Auftrennung von Proteinen über 2D-Gelelektrophorese.....	41
2.9.9	Proteinfärbemethoden	42
2.9.10	Probenvorbereitung für die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Fligh (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS).....	43
2.10	Computerprogramme, Datenbankrecherchen und Sequenzanalysen.....	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Proteomanalysen an Reis (<i>Oryza sativa</i> L.)	47
3.1.1	Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen über 2D-Gelelektro- phorese ergab keine Unterschiede in den Proteinmustern von Kontrollpflanzen und Pflanzen nach Überflutung.....	48
3.1.2	Analyse von phosphorylierten Proteinen aus dem löslichen Gesamtextrakt.....	51
3.1.3	Hypoxisch regulierte Proteine sind im Kernproteom detektierbar.....	52
3.1.4	Identifizierung von löslichen Gesamtproteinen über 2D-HPLC und SDS-PAGE	53

3.2	Die Rolle von <i>AtRAP2.2</i> bei der Anpassung von <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) an Hypoxie	63
3.2.1	Die Expression von <i>AtRAP2.2</i> wird innerhalb einer Stunde durch 5% Sauerstoff im Dunkeln induziert.....	63
3.2.2	<i>AtRAP2.2</i> und <i>OsSUB1</i> gehören zur Subfamilie der ERFs	65
3.2.3	$P_{AtRAP2.2}$:GUS Expressionsanalysen.....	67
3.2.4	<i>AtRAP2.2</i> und <i>AtADH1</i> sind in Wurzel und Spross differentiell exprimiert	68
3.2.5	<i>AtRAP2.2</i> wird durch Ethylen reguliert.....	69
3.2.6	Arabidopsispflanzen bilden unter hypoxischen Bedingungen im Dunkeln mehr Ethylen.....	74
3.2.7	Überexpression von <i>AtRAP2.2</i> induziert <i>AtADH1</i> Genexpression und <i>AtADH</i> Aktivität	75
3.2.8	<i>AtRAP2.2</i> ist im Proteom der Überexpressionslinie <i>AtRAP2.2ox3</i> in 2D-Gelen nicht nachweisbar	78
3.3	Repression von <i>AtRAP2.2</i> führt zur Repression von <i>AtADH1</i>	83
3.3.1	<i>AtRAP2.2ox3</i> Keimlinge wachsen vergleichbar dem Wildtyp	84
3.3.2	<i>AtRAP2.2</i> wird durch H_2O_2 im Spross induziert	86
4	Diskussion	88
4.1	Identifizierung von hypoxieregulierten Proteinen über Proteomanalytik.....	88
4.2	Proteomanalysen von <i>AtRAP2.2ox3</i> Linien.....	94
4.3	Regulation von <i>AtADH1</i> in Arabidopsis	95
4.4	Die Rolle von <i>AtRAP2.2</i> bei der ethylenvermittelten Anpassung an Hypoxie im Spross von Arabidopsis	100
4.5	<i>AtRAP2.2</i> induziert <i>AtADH1</i> möglicherweise in Kooperation mit einem weiteren Protein.....	103
4.6	Der Einfluss von Licht auf die Genregulation von <i>AtRAP2.2</i> und <i>AtADH1</i>	105
4.7	Physiologische Relevanz von <i>AtRAP2.2</i> bei der Anpassung an Hypoxie	106
5	Zusammenfassung	109
6	Summary	111
7	Literatur.....	112
8	Anhang.....	132
	Erklärung.....	135
	Danksagung	136
	Lebenslauf.....	137

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
ABA	Abscisinsäure
ABC	Ammoniumbicarbonat
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
ACHC	α -cyano-Hydroxyzimtsäure
ACN	Acetonitril
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACC-Synthase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AdoMet	S-Adenosylmethionin
ANP	<i>anaerobic polypeptide</i>
AP2	Apetala 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arc	<i>aerobic regulation control</i>
ARE	<i>anaerobic responsive element</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT	Aminotriazol
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bZIP	<i>basic-region leucin zipper</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy-DNA</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIM	<i>callus induction media</i>
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CSIRO	<i>Commonwealth Scientific and Research Organization</i>
CTR	<i>constitutive triple response</i>
cv.	kultivar
DIGE	Differenzielle Gelelektrophorese (<i>Difference Gel Electrophoresis</i>)
DZ	Differenzierungszone
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRE	<i>dehydration-responsive element</i>
DREB	<i>dehydration-response element binding</i>
DREPP	<i>developmentally regulated plasma membrane polypeptide</i>
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
EDF	<i>ethylene response DNA-binding factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EIN	ethyleninsensitiv (<i>ethylene insensitive</i>)
<i>EMSA</i>	<i>Electro Mobility Shift Assay</i>
ERF	<i>ethylene response factor</i>
ERS	<i>ethylene response sensor</i>
ETR	<i>ethylene response</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZ	Elongationszone
et al.	et alli
FNR	<i>fumarate nitrate reduction</i>
FR	<i>flood resistant</i>
g	Gravitationsbeschleunigung
GA	Gibberellin
GBF	<i>G-box binding factor</i>
GC	Gaschromatographie
GTP	Guanosin-Triphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
IAA	Iodacetamid
IM	interkalare Meristem
Hap	<i>heme acitvated protein</i>
HCl	Salzsäure
HDGF	<i>hepatoma-derived growth factor</i>
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPCF	<i>High Performance Chromato-Focussing</i>
HPLC	<i>High Performace Liquid Chromatography</i>
HR	Hypersensitivitätsreaktion
HRE	<i>hypoxia response element</i>

HvRAF	<i>hordeum vulgare root abundant factor</i>
Hsp	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH Gradient (<i>Immobilized pH Gradient</i>)
kb	Kilobasenpaare
<i>kd</i>	<i>knock-down</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
mA	Milli Ampere
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
MAPKKK	mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
1-MCP	1-Methylcyclopropen
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MTA	5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Medium nach Murashige and Skoog
NaAc	Natriumacetat
NAC	<i>nascent polypeptide-associated complex</i>
NL	nicht-linear
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
nt	Nukleotid
OBF	<i>octopine synthase element binding factor</i>
OD	Optische Dichte
<i>ox</i>	Überexpressionslinie
<i>osc</i>	<i>octopine synthase</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
GBF	<i>G-box binding factor</i>
PCD	programmierter Zelltod
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDC	Pyruvatdecarboxylase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pl	isoelektrischer Punkt
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PR	<i>pathogenesis-related</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon

QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RAV	<i>related to abscisic acid-insensitive 3/VIVIPAROUS1</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
Rop	RHO-ähnliches kleines G-Protein in Pflanzen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
Rox	<i>regulated by oxygen</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SCF	Skp1-Cullin1-F-Box
SDS	Natriumdodecylsulfat
SINAT2	<i>SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS 2</i>
SRP	Signalerkennungspartikel (<i>signal recognition particle</i>)
STI	<i>stress induced</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
STS	Silberthiosulfat
<i>SUB1</i>	<i>Submergence-1</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
Tris	Tri(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight per volume</i>)

1 Einleitung

1.1 Anpassungen von Reis (*Oryza sativa* L.) und *Arabidopsis thaliana* (L.) an Sauerstoffmangel

Pflanzen sind an ihren jeweiligen Standort gebunden, der aber nicht immer optimale Wachstumsbedingungen für sie bereitstellt. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen deshalb Anpassungsstrategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen, auch unter suboptimalen Bedingungen ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Überflutung ist ein häufiger abiotischer Stressfaktor, der das Wachstum der Pflanzen und ihre Entwicklung beeinflusst. Pflanzen sind aerobe Organismen, das heißt, sie atmen und benötigen Sauerstoff zur Energiegewinnung. Die Zellatmung besteht aus der Glykolyse, die im Cytoplasma abläuft und der oxidativen Decarboxylierung, dem Citratzyklus sowie der Atmungskette, die in den Mitochondrien stattfinden. Die Aufnahme des Sauerstoffs erfolgt entweder aus der Luft über die Stomata oder aus der Bodenluft über die Wurzeln. Sauerstoff wird auch in den Chloroplasten durch Photosynthese freigesetzt und kann ebenfalls zur Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien verbraucht werden.

In der Natur kommt es durch Überflutung von Pflanzen zu Hypoxie. Als Hypoxie wird der Zustand bezeichnet, bei dem die Sauerstoffkonzentration soweit abnimmt, dass sich der Stoffwechsel von aerob auf anaerob umstellt. Demzufolge wird der zur Verfügung stehende Sauerstoff für die ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung zum limitierenden Faktor. Die Sauerstoffaufnahme einer Pflanze ist abhängig von der Konzentration und der Diffusionsrate von Sauerstoff im umgebenden Medium. Die Diffusionsrate von Sauerstoff in Wasser ist jedoch 10.000 Mal geringer als in Luft (Armstrong, 1979), wodurch die Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser sehr gering ist. Bei Anoxie ist der Sauerstoffpartialdruck so niedrig, dass keine ATP-Synthese durch oxidative Phosphorylierung mehr möglich ist. ATP wird dann ausschließlich durch die Glykolyse gewonnen.

Überflutung wirkt sich negativ auf die Bodeneigenschaften aus, die das Pflanzenwachstum beeinflussen. Wenn die Bodenporen anstelle von Luft mit Wasser gefüllt sind, kommt es zum Beispiel zu einem veränderten Redoxstatus und damit zu einem veränderten pH-Wert des Bodens, wodurch die Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinträchtigt ist (Liesack et al., 2000). Als Folge eines Sauerstoffmangels im Boden breiten sich unter anderem anaerobe Mikroorganismen, wie zum Beispiel Denitrifizierer aus, die erhebliche Stickstoffverluste im Boden verursachen können. Sauerstoffabhängige Reaktionen wie die Stickstofffixierung sind unter diesen Bedingungen stark gehemmt (Wang und Martínez-Romero, 2000; Liesack et al., 2000). Eine schlechte Bodenbelüftung fördert des Weiteren

Wurzelkrankheiten (Hantula et al., 2000). Durch diese Faktoren kann es zum Absterben der Hauptwurzeln kommen.

Viele Pflanzen sind sehr sensitiv gegenüber Überflutungen, die durch starke Regenfälle oder künstlich geschaffene Bedingungen wie Bewässerung verursacht werden können. Um die Folgen eines reduzierten Sauerstoffangebotes zu bewältigen, haben Pflanzen unterschiedliche metabolische und morphologische Anpassungsmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, transiente Perioden einer kompletten oder partiellen Überflutung zu überleben. Hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel lassen sich Pflanzen in drei Kategorien unterteilen: flutungssensitive und flutungstolerante Pflanzen sowie Feuchtpflanzen (Buchanan et al., 2000) (Abbildung 1).

Flutungssensitive Pflanzen	Flutungstolerante Pflanzen	Feuchtpflanzen
<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)	<i>Oryza sativa</i> (Reis)
<i>Solanum lycopersicon</i> (Tomate)	<i>Hordeum vulgare</i> (Gerste)	<i>Rumex maritimus</i> (Uferampfer)
<i>Pisum sativum</i> (Erbse)	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	<i>Acorus calamus</i> (Kalmus)
	<i>Triticum aestivum</i> (Weizen)	<i>Echinochloa crus-galli</i> (Hühnerhirse)
	<i>Zea mays</i> (Mais)	<i>Zizania aquatica</i> (Wildreis)

Abbildung 1: Dargestellt sind beispielhaft Pflanzenarten, eingeteilt nach ihrer Sensitivität gegenüber Sauerstoffmangel (modifiziert nach Buchanan et al., 2000).

Reis und *Arabidopsis thaliana* (L.) sind zwei Modellpflanzen mit komplett sequenziertem Genom, die sich in ihrer Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel unterscheiden. In beiden Pflanzen wurden bereits Anpassungen an Sauerstoffmangel untersucht (Raskin und Kende, 1984; Kende et al., 1998; Klok et al., 2002; Gonzali et al., 2005; Liu et al., 2005). Anpassungsstrategien an Sauerstoffmangel von Reis und *Arabidopsis* werden nachfolgend erläutert und sind in Abbildung 2 exemplarisch für Reis zusammengefasst. Reis ist eine semi-aquatische Pflanze und als einzige überflutungstolerante Kulturpflanze sehr gut an hypoxische Bedingungen adaptiert. Tiefwasserreis wächst in Regionen Südostasiens, in denen es regelmäßig während der Monsunzeit zu Überschwemmungen kommt. Die Anpassung an Überflutung und einen dadurch bedingten Abfall der Sauerstoffkonzentration beruht auf zwei Strategien: der Vermeidung und der Toleranz von Sauerstoffmangel (Sauter, 2000). Vermeidungsstrategien sind morphologischer Art. Durch sehr schnelles Wachstum des jüngsten Internodiums gelingt es der Pflanze, ihre

Blätter über der Wasseroberfläche zu halten und somit das Sauerstoffdefizit zu minimieren (Vergara et al., 1976; Raskin und Kende, 1983; Kende et al., 1998). Reis weist bei einer Teilüberflutung eine Wachstumsrate von bis zu 25 cm pro Tag auf und kann insgesamt eine Länge von 7 m in Wassertiefen von bis zu 4 m erreichen (Vergara et al., 1976; Kende et al., 1998). Die physiologischen Ereignisse, die zum schnellen Streckungswachstum des jeweils jüngsten Internodiums führen, sind bekannt. Bei Überflutung der Reispflanze akkumuliert Ethylen innerhalb der Pflanze aufgrund seiner geringen Diffusionsrate in Wasser (Métraux und Kende, 1983). Zusätzlich ist die Ethylenbiosynthese im Pflanzengewebe erhöht (Métraux und Kende, 1983; Cohen und Kende, 1987; Mekhedov und Kende, 1996; Zarembinski und Theologis, 1997). Erhöhte Ethylengehalte führen zu reduzierten Konzentrationen von Abscisinsäure (ABA) und zu erhöhten Konzentrationen von Gibberellin (GA). Verantwortlich für die schnelle Streckung des jeweils jüngsten Internodiums ist schließlich das Phytohormon GA, dessen Gehalte nicht nur direkt durch Ethylen beeinflusst werden, sondern auch durch verringerte Gehalte des wachstumsinhibierenden Phytohormons ABA (Raskin und Kende, 1984; Kende et al., 1998). Das jüngste Internodium lässt sich in das interkalare Meristem (IM), die Elongationszone (EZ) und die Differenzierungszone (DZ) unterteilen (Sauter und Kende 1992; Kende et al., 1998) und diente als Pflanzenmaterial, um die Anpassung an Hypoxie zu untersuchen (Cohen und Kende, 1987; Mekhedov und Kende, 1996; Zarembinski und Theologis, 1997). Eine weitere wichtige morphologische Anpassung an Überflutung ist die Bildung von Aerenchymen in Wurzel und Spross, die den Gasaustausch im Gewebe erleichtern und den Transport von Sauerstoff aus der Luft in die Wurzeln ermöglichen (Justin und Armstrong, 1987; Kawai et al., 1998). Des Weiteren kommt es zum Wachstum von Adventivwurzeln, welche die Hauptwurzeln ersetzen können. Adventivwurzeln führen zu einer verbesserten Nährstoffaufnahme und zu verkürzten Transportwegen für Gase (Mergemann und Sauter, 2000; Steffens et al., 2005).

Die zweite Strategie ist die Ausprägung von Toleranz und beruht auf der Umstellung der metabolischen Aktivität von Atmung auf Gärung, bei Reis im Wesentlichen auf alkoholische Gärung (Sauter, 2000). Unter aeroben Bedingungen wird ATP fast ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gewonnen. Unter anaeroben Bedingungen fehlt Sauerstoff jedoch als finaler Elektronenakzeptor für die Atmungskette. Als Folge kann $\text{NADH}+\text{H}^+$ nicht reoxidiert werden. Damit die Pflanze die Glykolyse als sauerstoffunabhängigen Prozess in Abwesenheit der mitochondrialen Atmung aufrechterhalten kann, muss $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf einem anderen Weg reoxidiert werden, zum Beispiel durch die alkoholische Gärung. Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird in einem ersten Schritt durch das Enzym Pyruvatdecarboxylase (PDC) zu Acetaldehyd reduziert. In einem zweiten Schritt wird Acetaldehyd durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Ethanol reduziert. Dabei wird $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert. Somit

wird gewährleistet, dass die Glykolyse weiterhin ablaufen kann. Die ATP-Ausbeute ist unter anaeroben Bedingungen jedoch erheblich geringer, weil über Substratkettenphosphorylierung nur 2 mol ATP pro mol Glukose anstelle von 32 mol ATP pro mol Glukose unter aeroben Bedingungen gebildet werden.

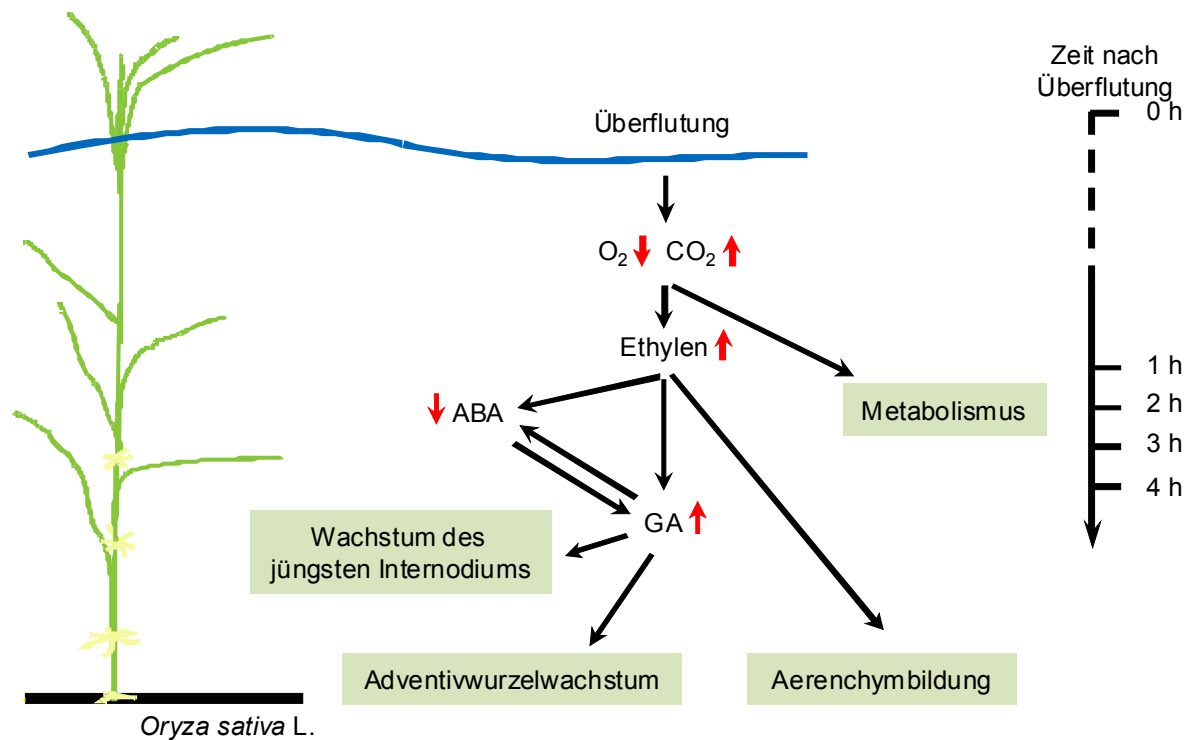


Abbildung 2: Anpassungsstrategien von Tiefwasserreis als Antwort auf Überflutung. Überflutung führt zu einer zellulären Abnahme der Sauerstoff- und zu einer Zunahme der Kohlenstoffdioxidkonzentration. Hormonelle Änderungen führen zu Anpassungen an hypoxische Bedingungen. ABA = Abscisinsäure; GA = Gibberellin.

Reis nimmt als Kulturpflanze weltweit einen sehr hohen Stellenwert ein. Insbesondere in Asien ist Reis die bedeutendste Nahrungsquelle für den Menschen. Tiefwasserreis ist in vielen Überschwemmungsgebieten Asiens die einzige Pflanze, die die Ernährung der Bevölkerung sichern kann. Der Ertrag von Tiefwasserreis ist im Vergleich zu den konventionell angebauten Sorten jedoch erheblich geringer. Da die Bevölkerung in vielen asiatischen Ländern überdurchschnittlich ansteigt, wächst der Druck auf die Züchtung von Sorten mit höherem Ertrag (Kende et al., 1998). Lange Zeit war unbekannt, wie eine Flutungstoleranz genetisch verankert ist. Fukao et al. (2006) und Xu et al. (2006) identifizierten in Indica-Flachlandreis einen *quantitative trait locus* (QTL), *Submergence-1* (*SUB1*), der Überflutungstoleranz vermittelt. Dieser Locus besteht aus einem variablen Cluster von drei *ethylene response factor* (ERF) Genen, *SUB1A*, *SUB1B* und *SUB1C*. Das *SUB1A* Gen ist nur in fünf von 17 Indica-Reissorten enthalten, aber nicht in Japonica-Reis.

SUB1A besteht aus dem toleranzspezifischen Allel *SUB1A-1*, welches den überflutungstoleranten Phänotyp verleiht und dem intoleranzspezifischen Allel *SUB1A-2*.

In der flutungstoleranten Indica-Reissorte FR13A (FR = *flood resistant*) war das Gen der *ADH1* stärker induziert als in der flutungssensitiven Japonica-Reissorte M202 cv. Nipponbare. Eine Transformation von M202 mit dem konstitutiv exprimierten *SUB1A* Gen führte im Vergleich zum Wildtyp zu verstärkten *ADH1* Transkriptmengen und zu einer erhöhten Überflutungstoleranz, die charakteristisch für FR13A war (Fukao et al., 2006; Xu et al., 2006). Ein Vergleich der intoleranten Sorte M202 mit der toleranten Sorte FR13A zeigte, dass die Strategie der Überflutungstoleranz darin besteht, Kohlenhydrate einzusparen und dadurch den Stress zu bewältigen. FR13A war in der Lage, eine komplette Überflutung bis zu zwei Wochen zu überleben (Fukao et al., 2006; Xu et al., 2006). Intolerante Reissorten weisen ein schnelles Wachstum auf und verbrauchen Kohlenhydratreserven, das nachteilig sein kann, wenn die Überflutung zu stark ist. Reisgenotypen, die das *SUB1A-1* Allel enthalten, haben deshalb eine zurückhaltende Strategie entwickelt, indem sie ihr Wachstum begrenzen und dadurch ihren Energie- und Kohlenhydratverbrauch reduzieren. Durch diese Strategie versuchen die Pflanzen, transiente Überflutung zu überleben und Kapazitäten für ein Wachstum aufzusparen, sobald die Überflutung zurückgeht (Perata und Voesenek, 2007). Diese Strategie ist jedoch zeitlich begrenzt. Tiefwasserreis hingegen ist in der Lage über Monate transiente Überflutung zu überdauern. Das Überleben unter überfluteten Bedingungen scheint eine Balance zwischen zwei gegensätzlichen Überlebensstrategien zu sein (Fukao und Bailey-Serres, 2004).

In *Arabidopsis* ist die Überflutungstoleranz, insbesondere in Hinblick auf morphologische Anpassungen, im Vergleich zu Reis, weniger stark ausgeprägt. Mühlenbock et al. (2007) berichteten von der Bildung von Aerenchymen sowohl in Wurzeln als auch im Hypokotyl. Eine Aerenchymbildung wurde ausschließlich in älteren Pflanzen, das heißt, in zwölf Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen nach sieben Tagen Überflutung festgestellt. In vier Wochen alten Pflanzen wurde keine Aerenchymbildung innerhalb von acht Tagen nach Überflutung beobachtet. *Arabidopsis* ist jedoch wie Reis in der Lage, den Metabolismus unter hypoxischen Bedingungen von Atmung auf Gärung umzustellen (Dolferus und Jacobs, 1984; Chang und Meyerowitz, 1986). Diese Anpassung an hypoxische Bedingungen macht *Arabidopsis* zu einem geeigneten Modellorganismus, um die molekularen Grundlagen dieser Adaptation zu studieren. Diverse Genexpressionsstudien wurden bereits durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die als Antwort auf Hypoxie (Klok et al., 2002; Liu et al., 2005) oder Anoxie (Gonzali et al., 2005) reguliert sind. Erkenntnisse aus *Arabidopsis* könnten dazu beitragen, Mechanismen der Anpassung von Pflanzen an Sauerstoffmangel besser zu verstehen und auf Nutzpflanzen zu übertragen (Dennis et al., 2000).

Das Gen der Alkoholdehydrogenase 1 aus Arabidopsis (*AtADH1*) wurde bereits als genetischer Marker und Modellgen verwendet, um Promotorelemente zu untersuchen, die in der Regulation von hypoxischen Genen involviert sind (Dolferus et al., 1994; Bruxelles et al., 1996). *AtADH1* wird durch Sauerstoffmangel, aber auch durch andere abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Trockenheit und Salinität induziert (Dolferus et al., 1994; Bruxelles et al., 1996). Einige *cis*- und *trans*-Elemente des *AtADH1*-Promotors wurden bereits beschrieben (DeLisle und Ferl, 1990a; Dolferus et al., 1994). Innerhalb des *AtADH1*-Promotors wurde ein *anaerobic responsive element* (ARE) identifiziert, das aus einem GT-Motiv (AAACCAA) und einem GC-Motiv (GCCC) besteht (Ferl und Laughner, 1989; Dolferus et al., 1994). Beide Motive sind für die Induktion unter Sauerstoffmangelbedingungen notwendig (Dolferus et al., 1994). Hoeren et al. (1998) zeigten, dass der Transkriptionsfaktor *AtMYB2* an das GT-Motiv bindet. *AtMYB2* wird als Antwort auf Sauerstoffmangel, aber auch durch andere Stressfaktoren wie Dehydration oder Salz und das Hormon ABA induziert (Urao et al., 1993; Hoeren et al., 1998). Yoo et al. (2005) fanden heraus, dass *AtMYB2* neben einer für MYB-Transkriptionsfaktoren typischen R2R3-MYB DNA-Bindedomäne (Gabrielsen et al., 1991; Stracke et al., 2001) zusätzlich eine Calmodulin-Bindedomäne aufweist. Der *AtADH1*-Promotor enthält des Weiteren eine G-Box, die mit dem Transkriptionsfaktor GBF (*G-box binding factor*) interagiert (DeLisle und Ferl, 1990b). Weitere *trans*-Elemente, die die *AtADH1* Genexpression regulieren, wurden bisher nicht identifiziert. Ein Modell zur Signaltransduktionskette, die zur Induktion der *AtADH1*-Genexpression führt, ist in (Abbildung 3) dargestellt.

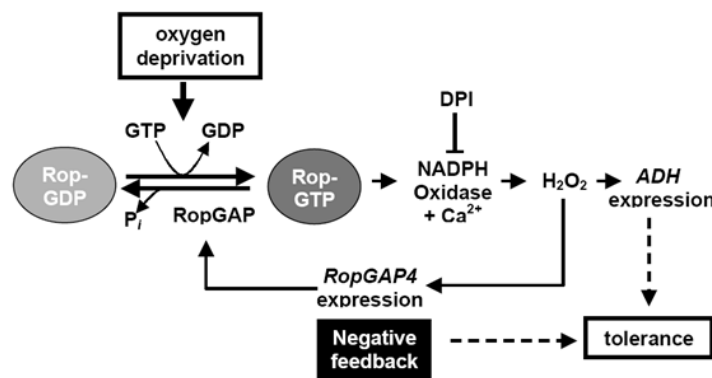


Abbildung 3: Modell der Rop-Signaltransduktion nach Baxter-Burrell et al., (2002): Regulation der *AtADH* Genexpression und der Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel in Arabidopsis. Reduzierte zelluläre Sauerstoffkonzentrationen aktivieren das kleine G-Protein Rop durch RopGAP. Rop-GTP und eine erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration stimulieren eine DPI-sensitive NADPH-Oxidase, die H_2O_2 Produktion fördert, wodurch es schließlich zur Induktion der *ADH* Genexpression kommt. Das Rop-Signal wird durch eine negative Feedbackreaktion von RopGAP4 kontrolliert, dessen Transkription durch H_2O_2 stimuliert wird.

Nach Baxter-Burrell et al. (2002) kommt es durch Sauerstoffmangel zur Aktivierung der GTPase Rop (RHO-ähnliches kleines G-Protein). Die Aktivierung von Rop führt zur erhöhten Produktion von Wasserstoffperoxid durch eine Diphenyliodoniumchlorid (DPI) sensitive calciumabhängige NADPH-Oxidase. Schließlich führen erhöhte Konzentrationen von Wasserstoffperoxid zur Induktion der *AtADH1* Genexpression.

1.2 Wahrnehmung von Sauerstoffmangel in Pflanzen und anderen Organismen

Für eine geeignete Reaktion auf Sauerstoffmangel müssen Organismen Änderungen der Sauerstoffkonzentration wahrnehmen. In Pflanzen ist bislang nicht bekannt, wie veränderte Sauerstoffkonzentrationen wahrgenommen werden. Mögliche Sauerstoffsensoren werden am Ende dieses Abschnittes besprochen.

Im Gegensatz zu Pflanzen sind in *Escherichia coli*, Rhizobien, *Saccharomyces cerevisiae* sowie in Metazoen Mechanismen der Sauerstoffwahrnehmung bekannt. Wie bei Pflanzen dient auch bei fakultativ aeroben Bakterien molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor bei der aeroben Atmung. Fakultativ aerobe Bakterien können auch anaerobe Atmung durchführen und andere Elektronenakzeptoren anstelle von Sauerstoff verwenden. Für die Umstellung von einer aeroben auf eine anaerobe Atmung wird ein Sensor benötigt, der dem Bakterium sinkende Sauerstoffkonzentrationen signalisiert. In *E. coli* werden Änderungen der Genregulation durch zwei unterschiedliche Wahrnehmungsmechanismen gesteuert: durch den Transkriptionsfaktor FNR (*fumarate nitrate reduction*) und das Zweikomponenten-System ArcAB (*aerobic regulation control*) (Gunsalus und Park, 1994). Der sauerstoffwahrnehmende Transkriptionsfaktor FNR aktiviert die Expression von Genen, die für den anaeroben Metabolismus benötigt werden. Die Regulation basiert auf einem Eisen-Schwefel-Cluster $[4\text{Fe-4S}]$. Unter anaeroben Bedingungen ist der Transkriptionsfaktor FNR aktiv und weist als Dimer einen $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster in jeder Untereinheit auf. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff erfolgt eine Konformationsänderung des aktiven $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters zu einem inaktiven $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster. Dadurch wird die Dimerisierung aufgehoben und FNR verliert seine DNA-Bindeaffinität (Kiley und Beinert, 1998, 2003; Jarvis und Green, 2007). Das Zweikomponenten-System ArcAB von *E. coli* kontrolliert die Expression vieler Gene des aeroben Metabolismus als Antwort auf Sauerstoff (Iuchi et al., 1990). Das Zweikomponenten-System besteht aus einer membrangebundenen Histidinkinase ArcB und dem Substratprotein ArcA. Sauerstoffmangel bewirkt die Autophosphorylierung von ArcB. Die Autophosphorylierung wird nicht durch das direkte Wahrnehmen von molekularem Sauerstoff ausgelöst, sondern als Antwort auf einen reduzierten Elektronenfluss in der

Atmungskette (Alexeeva et al., 2003). Die Autophosphorylierung des sensorischen Proteins ArcB bewirkt eine Phosphorylierung des regulatorischen Proteins ArcA, das Genexpression steuert.

Knöllchenbildende Bakterien wie Rhizobien oder Bradrhizobien, die in Wurzeln von Leguminosen vorkommen, gleichen ihren Metabolismus an veränderte Sauerstoffgehalte an, indem sie ebenfalls ein Zweikomponenten-System verwenden. Die direkte Wahrnehmung von Sauerstoff erfolgt durch das transmembrane FixL Protein, einer Histidinkinase mit einer sauerstoffdetektierenden Häm-Bindedomäne. In Abwesenheit von Sauerstoff wird die Kinase aktiviert und FixL autophosphoryliert. Ein Phosphat wird auf den Transkriptionsfaktor FixJ übertragen, der dadurch seine Konformation ändert und schließlich die Expression von Genen reguliert, die für eine Stickstofffixierung benötigt werden (Gilles-Gonzalez et al., 1991; Fischer, 1994; Gong et al., 1998).

S. cerevisiae ist ein fakultativ aerober Organismus. Anpassungen an veränderte Sauerstoffkonzentrationen werden durch mindestens drei Transkriptionsfaktoren reguliert. Unter aeroben Bedingungen fungieren Hap1p (*heme acitvated protein*) und Hap2/3/4/5p als Aktivatoren und regulieren die Expression von mehreren aeroben Genen (Hon et al., 2003). Rox1p (*regulated by oxygen*) hingegen verhindert als Repressor die Transkription von hypoxischen Genen unter aeroben Bedingungen. Dem sauerstoffbindenden Häm-Molekül kommt bei der Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle zuteil. Anders als bei der direkten Sauerstoffwahrnehmung in Bakterien, die durch Transkriptionsfaktoren mit einer Häm-Domäne erfolgt, findet in *S. cerevisiae* eine *de novo* Synthese von Häm statt. Die Häm-Biosynthese ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration. Unter unzureichenden Sauerstoffbedingungen findet somit keine Häm-Biosynthese statt, und die Repression von hypoxischen Genen durch Rox1p wird aufgehoben. Auch die Aktivierung der Transkription von aeroben Genen wird durch Hap-Transkriptionsfaktoren unterbunden, die Häm für ihre Aktivierung benötigen (Kwast et al., 1998; Zhang und Hach, 1999; Hon et al., 2003).

Der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) wird in allen Metazoen exprimiert und reguliert unter hypoxischen Bedingungen die Transkription von mehr als hundert Genen. HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten, einer α - und β -Untereinheit (Liu und Semenza, 2007). Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert, jedoch wird die α -Untereinheit unter normoxischen Bedingungen proteasomal degradiert. Die Degradierung wird durch eine sauerstoffabhängige Prolylhydrolase reguliert. Unter hypoxischen Bedingungen entgeht die α -Untereinheit einem proteasomalen Abbau und bildet ein Heterodimer mit der β -Untereinheit. Die Dimerisierung ermöglicht HIF-1, an Promotorbereiche mit einem *hypoxia response element* (HRE) zu binden und die Expression von Zielgenen zu regulieren. Die ständige Verfügbarkeit von HIF-1 α ermöglicht eine schnelle Anpassung an sinkende Sauerstoffkonzentrationen (Salceda und Caro 1997; Sutter et al.,

2000; Liu und Semenza, 2007). In Pflanzen wurden bisher keine Gene mit Sequenzähnlichkeit zu HIF-1 gefunden.

Ob die Wahrnehmung der Sauerstoffkonzentration in Pflanzen indirekt oder direkt erfolgt, ist nicht geklärt. Ein Sauerstoffsensor wurde in Pflanzen noch nicht identifiziert. Eine indirekte Wahrnehmung von Änderungen in der Sauerstoffkonzentration könnte durch einen Anstieg von Ca^{2+} , ROS und/oder durch einen Abfall der ATP-Konzentration sowie des cytosolischen pH-Wertes erfolgen. Als direktes sauerstoffbindendes Molekül wurde Hämoglobin diskutiert. Die Funktion der meisten pflanzlichen Hämoglobine ist unbekannt (Hunt et al., 2001). In Pflanzen existieren zwei Typen von Hämoglobinen, symbiotisches (Leghämoglobin) und nicht symbiotisches Hämoglobin. Symbiotische Hämoglobine wurden ursprünglich in Leguminosen gefunden, in denen sie die Funktion haben, während der Stickstofffixierung Sauerstoff zu transportieren (Bergersen et al., 1976). Hunt et al. (2002) zeigten, dass Hypoxie die Expression des nicht symbiotischen Hämoglobins *AtGLB1* induziert, und dass eine Überexpression von *AtGLB1* im Vergleich zum Wildtyp zu einem verstärkten Überleben von hypoxisch gestressten Pflanzen führt. Als potentielle Sensoren scheinen sie aufgrund ihrer sehr geringen Dissoziationskonstante jedoch nicht in Frage zu kommen (Dordas et al., 2003).

Die durch Überflutung hervorgerufenen Änderungen in der endogenen Gaszusammensetzung machen des Weiteren Kohlenstoffdioxid und Ethylen zu potentiellen Signalüberträgern. Licht scheint nach Voesenek et al. (2006) im Wahrnehmungsprozeß ebenfalls eine Rolle zu spielen, weil Licht die interne Gaszusammensetzung sowohl über die Photosynthese als auch durch die Atmung beeinflusst. Überflutete Pflanzenteile sind je nach Trübe des Wassers unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt. Auch die Ethylenbiosynthese wird durch Licht beeinflusst und ist im Dunkeln stärker (Jiao et al., 1987; Rieu et al., 2005; Wang et al., 2005). Mögliche Interaktionen zwischen Ethylen und Sauerstoffmangel wurden in der Literatur diskutiert und werden in Abschnitt 1.3.3 erläutert.

1.3 Die Rolle von Ethylen bei der Anpassung an Hypoxie

Das gasförmige Hormon Ethylen reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen wie Keimung, Seneszenz, Abzission, Zellstreckung, Fruchtreife und Blütenentwicklung. Unter diesen physiologischen Prozessen ist die Ethylenbiosynthese stark erhöht. Zusätzlich spielt Ethylen eine bedeutende Rolle in der Antwort auf biotische oder abiotische Stressbedingungen wie zum Beispiel auf Überflutung (Benavente und Alonso, 2006; Chen et al., 2005). Es weist vieles darauf hin, dass Ethylen eine wichtige Signalkomponente in der Regulation der frühen Antwort auf Sauerstoffmangel darstellt (Grichko und Glick, 2001; Dat et al., 2004; Voesenek et al., 2006; Jackson, 2008).

1.3.1 Ethylenbiosynthese

Ethylen wird aus der Aminosäure Methionin synthetisiert. Die S-Adenosylmethionin Synthetase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Methionin zu S-Adenosylmethionin (AdoMet) (Abbildung 4). Die spezifische Ethylenbiosynthese vollzieht sich in zwei nachfolgenden Schritten. Der erste Schritt ist die Umwandlung von Ado-Met zu 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) und 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) durch das Enzym ACC-Synthase (ACS) (Adams und Yang, 1979). Während MTA zu Methionin durch den Yang-Zyklus recycelt wird (Miyazaki und Yang, 1987), katalysiert das Enzym ACC-Oxidase (ACO) in einem zweiten Schritt die Bildung von Ethylen, Kohlenstoffdioxid und Cyanid aus ACC. Cyanid wird durch das Enzym β -Cyanoalanin Synthase zu β -Cyanoalanin detoxifiziert. Die Umwandlung von ACC zu Ethylen durch ACO benötigt auch eine begleitende Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser und die Oxidation von Ascorbat zu Dehydroascorbat (Yang und Hoffmann, 1984; Mirica und Klinman, 2008). Kohlenstoffdioxid ist ein Aktivator der ACO (Fernandez-Maculet et al., 1993; Poneleit und Dilley, 1993).

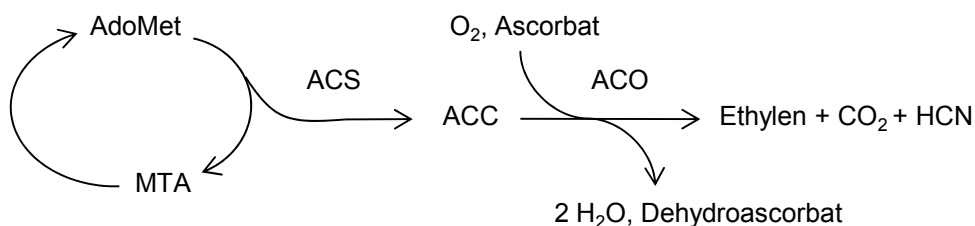


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Ethylenbiosynthese. Das Enzym ACS (ACC-Synthase) katalysiert die Umwandlung von AdoMet (S-Adenosylmethionin) zu ACC (1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure) und MTA (Methylthioadenosin). MTA wird im Yang-Zyklus zu Methionin recycelt. ACC wird durch das Enzym ACO (ACC-Oxidase) zu Ethylen, Kohlenstoffdioxid und Cyanid umgewandelt. Diese Reaktion ist sauerstoffabhängig und benötigt die Reduktion von Ascorbat zu Dehydroascorbat.

Die ACS-Gene werden von einer Multigenfamilie kodiert. In Arabidopsis gibt es insgesamt zwölf *AtACS*-Gene, wobei *AtACS1* für ein katalytisch inaktives Protein kodiert, *AtACS3* ein Pseudogen ist und *AtACS10* sowie *AtACS12* für Aminotransferasen kodieren (Liang et al., 1992, 1995; Yamagami et al., 2003; Wang et al., 2004). In Arabidopsis können ACS-Proteine abhängig von ihrer C-terminalen Sequenz in drei Gruppen unterteilt werden und unterliegen aufgrund dessen unterschiedlichen Regulationsmechanismen (Argueso et al., 2007). Das Vorhandensein von acht funktionell aktiven ACS-Enzymen könnte ein Regulationsmechanismus für die Vielseitigkeit von Ethylenantworten sein. Es gibt der Pflanze die Möglichkeit, die Produktion von Ethylen als Antwort auf unterschiedliche

entwicklungs- und umweltbedingte Stimuli zu regulieren (Argueso et al., 2007). Das Enzym ACO gehört ebenfalls zu einer Multigenfamilie, die für Proteine der Familie der sauerstoffaktivierenden *nonheme iron* Enzymen kodieren, die ein 2-Histidin-1-Carboxylsäure eisenbindendes Motiv charakterisiert (Zhang et al., 1997; Mirica und Klinman, 2008).

Unter nicht gestressten Bedingungen ist die ACS-Aktivität limitierend für die Ethylenbiosynthese (Yang und Hoffman, 1984; Kende, 1993). In überfluteten Pflanzen kann die ACO-Aktivität zum limitierenden Faktor werden (Vriezen et al., 1999).

1.3.2 Ethylensignaltransduktion

In *Arabidopsis* wird Ethylen von einer Familie aus fünf Rezeptoren wahrgenommen, ETR1, ETR2 (*ethylene response*), ERS1, ERS2 (*ethylene response sensor*) und EIN4 (*ethylene insensitive*), die in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind (Chang et al., 1993; Chen et al., 2002). Basierend auf struktureller Ähnlichkeit lässt sich die Rezeptorfamilie in zwei Typen unterteilen. Die Typ-I Rezeptoren ETR1 und ERS1 enthalten drei hydrophobe Transmembrandomänen im N-Terminus und weisen eine konservierte Histidinkinase-Domäne im C-Terminus auf. Die Typ-II Rezeptoren ETR2, ERS2 und EIN4 besitzen vier hydrophobe Transmembrandomänen und eine degenerierte Histidinkinase-Domäne ohne katalytische Aktivität (Chang et al., 1993; Hua et al., 1995). Die Rezeptoren sind über Disulfidbrücken verbundene Dimere, die für ihre Funktionalität Kupfer als Cofaktor benötigen. Die Verfügbarkeit von Kupfer hängt von RAN1 ab, einem Homolog der humanen Menkes Wilson P-Typ ATPase (Hirayama et al., 1999; Woeste und Kieber, 2000). Ethylenrezeptoren sind negative Regulatoren der Ethylensignaltransduktion (Hua und Meyerowitz, 1998) (Abbildung 5). Die nächste Signalkomponente stromabwärts ist CTR1 (*constitutive triple response*), eine Raf-ähnliche Serin-Threonin Proteinkinase mit Sequenzähnlichkeit zu MAPKKK (mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase). CTR1 ist ebenfalls ein negativer Regulator der Ethylensignaltransduktion (Kieber et al., 1993). In Anwesenheit von Ethylen kommt es zu einer Inaktivierung der Rezeptoren, wodurch diese nicht mehr in der Lage sind, die von CTR1 vermittelte Inhibierung zu stimulieren. Eine Aktivierung einer MAPKKK wurde zwar in *Medicago truncatula* und *Arabidopsis* gezeigt (Ouaked et al., 2003), jedoch hatte ein Ausschalten der in *Arabidopsis* aktivierten MAPK *MPK6* keine Auswirkung auf die Ethylensignaltransduktion (Ecker, 2004; Menke et al., 2004). Yoo et al. (2008) berichteten von einer MKK9-MPK3/MPK6 Kaskade, die eine EIN3 vermittelte Transkription fördert. Stromabwärts von CTR1 agiert das integrale Membranprotein EIN2 mit unbekannter Funktion. EIN2 weist Sequenzähnlichkeit zur Familie der Nrmp Proteine auf, die bisher in allen Organismen gefunden wurden (Fleet et al., 1998) und von denen viele als Transporter fungieren. Es wurde vermutet, dass EIN2 als

Metalltransporter agieren könnte. Eine Transportaktivität konnte nicht nachgewiesen werden. EIN2 ist ein wesentlicher positiver Regulator des Ethylensignalweges, weil eine *loss-of-function* Mutation zu einer kompletten Ethyleninsensitivität führt (Alonso et al., 1999). Durch die Aufhebung der Inaktivierung von CTR1 wird EIN2 aktiviert. Die Aktivierung von EIN2 bewirkt die Akkumulation von EIN3 im Kern, indem dessen Abbau verhindert wird. Es gibt zwei Möglichkeiten der Stabilisierung von EIN3 durch EIN2: Entweder wird EIN3 direkt oder indirekt durch die Inhibierung des SCF^{EBF} Komplexes stabilisiert (Olmedo et al., 2006). EIN3 bindet an Promotorbereiche von Zielgenen und induziert die Expression von Genen wie die von ERF1 (*ethylene response factor 1*) und von EDFs (*ethylene response DNA-binding factors*), die schließlich eine Reihe von Ethylenantworten regulieren (Chao et al., 1997; Olmedo et al., 2006). In Arabidopsis gehört EIN3 zu einer Familie zusammen mit EIN3-like 1 (EIL1), EIL2, EIL3, EIL4 und EIL5. EIN3 *loss-of-function* Mutationen zeigen aus diesem Grund auch nur eine partielle Ethyleninsensitivität.

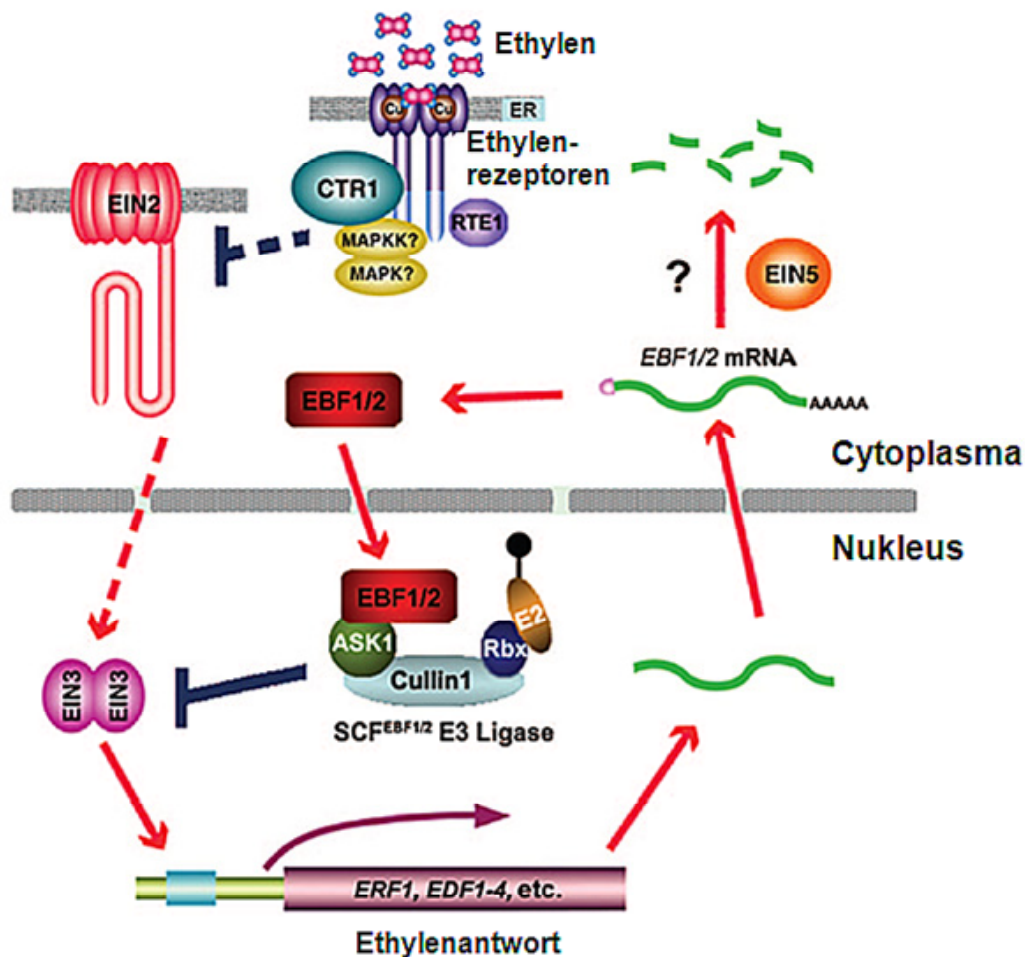


Abbildung 5: Ethylensignalweg (nach Olmedo et al., 2006). In Anwesenheit von Ethylen werden die Rezeptoren inaktiviert, wodurch diese nicht in der Lage sind, die von CTR1 vermittelte Inhibition zu stimulieren. Als Folge wird EIN2 aktiviert und verhindert die Degradierung von EIN3. EIN3 akkumuliert im Kern und aktiviert die Transkription von ERF-Genen.

In Abwesenheit von Ethylen sind die Rezeptoren aktiv und unterdrücken eine Ethylenantwort, indem sie die negative Regulation von CTR1 stimulieren. EIN3 wird daraufhin mit Ubiquitin markiert und proteasomal degradiert. Der Abbau wird durch einen Skp1-Cullin1-F-Box (SCF) Komplex bestehend aus zwei F-Box Proteinen, EBF1 und EBF2, vermittelt. Dadurch unterbleibt eine Ethylenantwort. Die EBF1 und EBF2 Genexpression wird durch Ethylen und abhängig von EIN3 induziert, wodurch EIN3 einer negativen Feedbackregulation unterliegt. *EIN5* kodiert eine 5' → 3' Exoribonuklease, XRN4, die die mRNA der F-box Proteine EBF1 und EBF2 reguliert (Guo und Ecker, 2003; Olmedo et al., 2006) (Abbildung 5).

1.3.3 Interaktion von Ethylen und Sauerstoffmangel

In Reis, *Arabidopsis* und *Rumex palustris* steigen Ethylengehalte innerhalb der ersten Stunden nach Überflutung stark an (Métraux and Kende, 1983; Peng et al., 2001; Voesenek et al., 1993). In Reis ist das schnelle Streckungswachstum des jüngsten Internodiums eine Anpassung an Überflutung. Wie unter 1.1 beschrieben, führt die Änderung der endogenen Gaszusammensetzung durch Überflutung zu einem Anstieg der Ethylenkonzentration. Erhöhte Ethylengehalte bewirken Änderungen der Gehalte von ABA und GA. Als wachstumsförderndes Phytohormon ist GA schließlich verantwortlich für das schnelle Streckungswachstum des jüngsten Internodiums. Métraux und Kende (1983) stellten erhöhte Ethylengehalte in überfluteten Reisstängeln fest und testeten, ob eine erhöhte endogene Ethylenkonzentration auf eine, zumindest teilweise, erhöhte Ethylenbiosynthese oder ausschließlich auf eine physikalische Ethylenakkumulation zurückzuführen ist. Es zeigte sich, dass die Ursache für erhöhte endogene Ethylengehalte eine Kombination beider Effekte war (Métraux und Kende, 1983). In überfluteten Reisinternodien wurde im Vergleich zu nicht gefluteten Reisinternodien eine bis zu 8-fach erhöhte *in vivo* ACS-Aktivität im interkalaren Meristem (IM) und in der Elongationszone (EZ) festgestellt. Die ACS-Aktivität stieg innerhalb von zwei Stunden nach Überflutung an, erreichte eine maximale Aktivität nach vier Stunden und blieb bis zum Ende der Messung nach 24 Stunden erhöht (Cohen und Kende, 1987). *OsACS1* Genexpressionsanalysen von Mekhedov und Kende (1996) zeigten jedoch keine erhöhten Transkriptmengen nach Überflutung. Zarebinski und Theologis (1997) hingegen fanden eine Induktion von *OsACS1* innerhalb von 12 Stunden nach Überflutung und eine Repression von *OsACS2*. Van der Straeten et al. (2001) entdeckten ein weiteres Mitglied der ACS-Familie, *OsACS5*, dessen Transkriptmengen nach vier Stunden Überflutung zunahm und dadurch zu erhöhten Ethylengehalten beitrug.

Mekhedov und Kende (1996) untersuchten des Weiteren, ob eine erhöhte Ethylenbiosynthese auch auf eine erhöhte Aktivität der ACO zurückzuführen ist. Tatsächlich

stellten sie sowohl erhöhte Transkriptmengen von *OsACO1* als auch eine erhöhte Enzymaktivität von OsACO nach vier bis 24 Stunden Überflutung fest. Signal für eine verstärkte Ethylenbiosynthese im Gewebe des jüngsten Internodiums von Reis scheint nach Cohen und Kende (1987) Sauerstoffmangel zu sein. Hypoxie stimulierte jedoch nicht in allen Geweben der Reispflanze die Ethylenbiosynthese. In den Blattscheiden, die das Internodium umgeben, war die Ethylenbiosynthese unter reduzierten Sauerstoffkonzentrationen gehemmt (Raskin und Kende, 1984; Cohen und Kende, 1987). Bei Hemmung der Ethylenbiosynthese, wie zum Beispiel bei Anaerobiose, kommt es aufgrund der Inhibierung der ACO, die Sauerstoff benötigt, zu keinem Streckungswachstum des jüngsten Internodiums.

Auch Licht oder Dunkelheit wirken sich auf die Streckung des jüngsten Internodiums aus. Um die Auswirkung von Licht und Dunkelheit zu untersuchen, führten Raskin und Kende (1984) Versuche mit Reisstängeln durch, die eine sehr ähnliche Wachstumsantwort wie intakte Pflanzen zeigten. Reisstängel, die für drei Tage bei einer Photoperiode, Dunkelheit oder kontinuierlichem Licht mit verschiedenen Sauerstoff-, Kohlenstoffdioxid- und Ethylenkonzentrationen behandelt oder überflutet wurden, zeigten unterschiedliche Wachstumsantworten. Überflutung während einer Dunkelperiode führte nur zu einem sehr geringen Wachstum des jüngsten Internodiums (Raskin und Kende, 1984). In Blättern von Reispflanzen hingegen war eine Ethylenbiosynthese bei Licht gehemmt (Kao und Yang, 1982). Die Hemmung beruht auf einer Inhibition der Umwandlung von ACC zu Ethylen und wird nach Kao und Yang (1982) durch die Verringerung der internen Kohlenstoffdioxidkonzentration vermittelt. Zwar fanden Raskin und Kende (1984) heraus, dass Kohlenstoffdioxid zu einem geringen Maß die Streckung des jüngsten Internodiums fördert, jedoch stimulierte Kohlenstoffdioxid anders als in Blättern nicht die Ethylenproduktion.

In *Arabidopsis* untersuchten Peng et al. (2005) die Expression von *AtACS* Genen nach hypoxischer Behandlung von 0 bis 36 Stunden sowohl im Spross als auch in der Wurzel. Transkriptmengen von *AtACS2*, *AtACS6*, *AtACS7* und *AtACS9* waren unter hypoxischen Bedingungen induziert, jedoch mit einem unterschiedlichen Genexpressionmuster sowohl im Spross als auch in der Wurzel, als auch abhängig von der Dauer der hypoxischen Behandlung. Im Spross waren Transkriptmengen von *AtACS2*, *AtACS6* und *AtACS7* nach drei Stunden Hypoxie erhöht (Peng et al., 2005).

Rumex palustris ist eine semi-aquatische Pflanze, die als Antwort auf Überflutung ihre Blattstiele streckt und ein hyponastisches Wachstum zeigt, um einen Teil der Blätter über der Wasseroberfläche zu halten (Voeselek et al., 1990; Rieu et al., 2005). Niedrige Sauerstoffkonzentrationen stimulieren ethylenabhängig das Streckungswachstum der Blattstiele (Voeselek et al.; 1997). Wie bei Reis akkumuliert Ethylen innerhalb einer Stunde nach Überflutung aufgrund seiner geringen Diffusionsrate in Wasser und initiiert diese morphologische Anpassung. Die Ethylenbiosynthese ist in *Rumex* bei Überflutung, trotz

erhöhter Transkriptmengen von *RP-ACS1* und *RP-ACO1* und erhöhter Enzymaktivitäten von RP-ACS, nicht erhöht, sondern gleichbleibend (Voeselek et al., 1993; Vriezen et al., 1999; Rieu et al., 2005). In *Rumex* ist die ACC-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen stark erhöht, jedoch nimmt die Umwandlung zu Ethylen bei Überflutung ab. Eine Limitierung der Ethylenbiosynthese scheint deshalb auf der Ebene der RP-ACO-Aktivität stattzufinden. Nach Vriezen et al. (1999) wird die Enzymkonzentration von RP-ACO erhöht, um die geringere RP-ACO-Aktivität unter Sauerstoffmangel auszugleichen und dadurch ausreichend Ethylen zu produzieren, so dass die Streckung der Blattstiele stimuliert wird.

Das Phytohormon Ethylen spielt auch bei weiteren morphologischen Anpassungen wie bei der Aerenchymbildung (He et al., 1996) und beim Adventivwurzelwachstum eine Rolle (Visser et al., 1996; Steffens und Sauter, 2005; Steffens et al., 2005). Adventivwurzelwachstum wird durch Ethylen induziert. Unter normoxischen Bedingungen sind die Primordien der Adventivwurzeln von Epidermiszellen bedeckt. Bei Überflutung löst Ethylen programmierten Zelltod (PCD) der Epidermiszellen aus und initiiert das Adventivwurzelwachstum (Steffens et al., 2005). In Reis ist die Aerenchymbildung konstitutiv und wird durch Überflutung weiter verstärkt (Jackson et al., 1985; Jackson, 1985; Justin und Armstrong, 1991; Kawai et al., 1998). Die flutungsinduzierte Aerenchymbildung ist ethylenabhängig. Generell wird bei der Aerenchymbildung zwischen zwei Formen unterschieden, der schizogenen und der lysigenen Aerenchymbildung. Die schizogene Aerenchymbildung beinhaltet Zellwandreorganisation und Zellteilung, während die lysigenen Aerenchymbildung eine Konsequenz aus PCD und Zellauflösung darstellt. In Mais wird die Aerenchymbildung ebenfalls durch Überflutung induziert. Hypoxie fördert erhöhte Ethylengehalte innerhalb des Gewebes, wodurch es zum PCD und schließlich zur lysigenen Aerenchymbildung kommt (Drew et al., 1981; Jackson, 1985; He et al., 1996; Drew et al., 2000). Unter anaeroben Bedingungen werden keine Aerenchyme gebildet, weil die Umwandlung von ACC zu Ethylen Sauerstoff benötigt und somit die Ethylenbiosynthese gehemmt wird (Drew et al., 1979; Jackson et al., 1985). Die Initiierung von PCD erfolgt durch Ethylen. He et al. (1996) zeigten, dass die Hemmung des Phosphoinositidmetabolismus und die Verringerung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration Zelltod verhindern, weshalb gefolgert wurde, dass diese beiden Komponenten an der Signaltransduktion, die zur Aerenchymbildung führt, beteiligt sind. Es gibt Anhaltspunkte, dass Ca^{2+} auch im Signalweg involviert ist, der zur Aktivierung der *ADH* Genexpression führt (Subbaiah et al., 1994; Baxter-Burrell et al., 2002).

In *Arabidopsis* untersuchten Peng et al. (2001) den Einfluss von Ethylen auf die Expression von *AtADH1*. Die durch Hypoxie hervorgerufene Induktion der *AtADH1* konnte durch den ACS-Inhibitor Aminoxyessigsäure (AOA) teilweise inhibiert werden. Eine Zugabe von ACC hob diese Inhibierung wieder auf. Aufgrund der Beobachtung, dass exogenes

Ethylen nicht ausreichte, um die *AtADH1* Genexpression unter normoxischen Bedingungen zu induzieren, schlossen Peng et al. (2001), dass ein Ethylensignal zwar für die Induktion der *AtADH1* gebraucht wird, jedoch nicht ausreichend für dessen Induktion ist. Eine Interaktion von Ethylen und der Rop-aktivierten Signalkette, die zur Aktivierung der *AtADH1* führt, wurde bisher nicht gezeigt. In Reis stellten Fukao et al. (2006) ein Modell auf, das die Abläufe der Überflutungstoleranz enthält, die mit dem ERF/AP2-Transkriptionsfaktor SUB1A in Verbindung stehen. Das Modell stellt unter anderem die Aktivierung der Gene der *PDC* und der *ADH* durch SUB1A dar.

1.3.4 AP2/ERF Proteine

AP2/ERF-Proteine sind transkriptionelle Regulatoren einer Vielzahl von wachstums- und entwicklungsabhängigen Prozessen sowie von abiotischen und biotischen Stressantworten in Pflanzen (Fujimoto et al., 2000; Nakano et al., 2006). Nach Sakuma et al. (2002) besteht die AP2/ERF-Genfamilie in Arabidopsis aus 145 Mitgliedern, die in fünf Subfamilien gegliedert sind: *dehydration-response element binding* (DREB), *ethylene response factor* (ERF), APETALA2 (AP2), *related to abscisic acid-insensitive 3/VIVIPAROUS1* (RAV) und weitere (*others*). Die DREB- und die ERF-Subfamilie wurden des Weiteren in Subgruppen unterteilt, DREB in A-1 bis A-6 und ERF in B-1 bis B-6 (Abbildung 6).

Nakano et al. (2006) führte eine genomweite Analyse der ERF-Genfamilie in Arabidopsis und Reis durch und klassifizierte die AP2/ERF-Familie neu, und zwar in vier Familien: AP2, ERF, At4g13040 und RAV. Die AP2/ERF-Familie enthält 147 Gene in Arabidopsis, von denen 122 zur ERF-Familie gehören. In Reis wurden 139 ERF-Gene identifiziert. Um eine phylogenetische Beziehung der Gene der ERF-Familie herzustellen, wurde eine Subklassifizierung durchgeführt (Nakano et al., 2006). In Arabidopsis wurde die ERF-Familie in zwölf Gruppen, in Reis in 15 Gruppen unterteilt. Elf dieser Gruppen waren in beiden Pflanzenarten vertreten.

Die AP2-Domäne wurde als wiederholendes Motiv im APETALA2-Protein in Arabidopsis identifiziert, das die Blütenentwicklung steuert (Jofuku et al., 1994). Proteine der ERF-Familie enthalten nur eine einzige AP2/ERF-Domäne (Nakano et al., 2006). In Arabidopsis besteht eine AP2-Domäne aus insgesamt 68 Aminosäuren, die sich in zwei konservierte Bereiche, einem YRG- und RAYD-Element, unterteilen lassen. Das YRG-Element besteht aus 19 bis 22 Aminosäuren und ist sehr basisch. Das RAYD-Element ist 42 bis 43 Aminosäuren lang und enthält eine 18 Aminosäuren lange Kernregion. Zusätzlich befinden sich invariante Aminosäurereste innerhalb der YRG- und RAYD-Elemente, die eine entscheidende Rolle für die Struktur und Funktion dieser Proteine haben könnten. Generell ist die AP2-Domäne an der DNA-Bindung beteiligt (Okamuro et al., 1997).

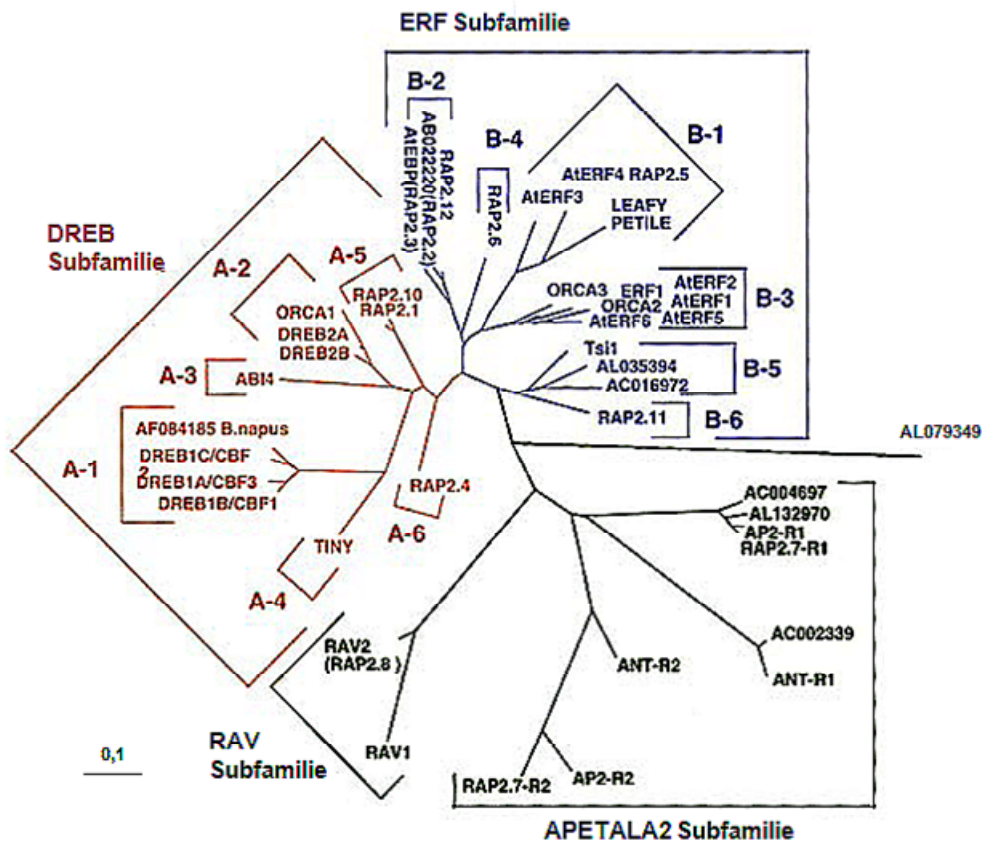


Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum von ERF/AP2-Proteinen nach Sakuma et al. (2002). Die AP2/ERF-Genfamilie ist in fünf Subfamilien unterteilt: DREB, ERF, RAV, APETALA2 und weitere (*others*). Die DREB-Subfamilie untergliedert sich in die Subgruppen A-1 bis A-6 und die ERF-Subfamilie in die Subgruppen B-1 bis B-6.

ERFs können als Aktivatoren oder Repressoren an GCC-Box (AGCCGCC) Elemente in den Promotoren von Genen binden, die als Antwort auf Ethylen reguliert werden (Ohme-Takagi und Shinshi, 1995; Fujimoto et al., 2000). ERFs spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen wie zum Beispiel bei Blüten- und Samenentwicklung (Riechmann und Meyerowitz, 1998), sowie bei der abiotischen und biotischen Stressantwort (Büttner und Singh, 1997; Fujimoto et al., 2000; Sakuma et al., 2002). Einige Mitglieder der ERF-Familie vermitteln eine Antwort auf Cytokinine (Rashotte et al., 2006).

OsSUB1A ist ein AP2/ERF-Transkriptionsfaktor, der bei Überflutung hochreguliert ist und Überflutungstoleranz in Indica-Reissorten vermittelt (Fukao et al., 2006; Xu et al., 2006). OsSUB1A gehört zur ERF-Familie und zur nach Nakano et al. (2006) klassifizierten Untergruppe VII, die der nach Sakuma et al. (2002) klassifizierten B-2 Gruppe entspricht. Ein weiteres Beispiel für einen AP2/ERF-Transkriptionsfaktor ist *AtRAP2.2*, der in einem *Microarray Screening* als hochregulierter Transkriptionsfaktor bei Sauerstoffmangel in Arabidopsiswurzelkulturen identifiziert wurde (Klok et al., 2002). *AtRAP2.2* gehört zur

Subfamilie der ERFs und ebenfalls zur Subgruppe B-2. AtRAP2.2 zeigt größte Sequenzähnlichkeit zu AtRAP2.12 und AtRAP2.3. Bisher ist zur Funktion von AtRAP2.2 nicht viel bekannt. Welsch et al. (2007) zeigten kürzlich, dass AtRAP2.2 an das *cis*-Element ATCTA bindet. Dieses Element wurde im Phytoen-Synthase Promotor gefunden und ist verantwortlich für die starke basale Expression des Gens. Die Phytoen-Synthase ist das erste spezifische Enzym der Carotinoidbiosynthese. Als ein AtRAP2.2 Interaktionsprotein konnte das RING-Fingerprotein *SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS 2* (SINAT2) identifiziert werden. Expressionsdaten der *Microarray*-Datenbank Genevestigator zeigen, dass *AtRAP2.2* während des PCD stark hochreguliert ist. Der ERF-Typ Transkriptionsfaktor, *HvRAF* (*Hordeum vulgare root abundant factor*), verleiht Gerste eine verstärkte Pathogenresistenz und Salztoleranz. Transkriptmengen von *HvRAF* sind in Wurzeln von jungen Gerstenkeimlingen höher als in Blättern. Die größten Sequenzähnlichkeiten zu *HvRAF* weisen AAK92635 in Reis und RAP2.2 in Arabidopsis auf. *HvRAF* verfügt über eine charakteristische Sequenz einer Hemopexin-Domäne, die für die Aktivität wichtig ist (Jung et al., 2007).

1.4 Proteomanalysen

Die Genome einer Reihe von Organismen wurden durch weltweite Genomprojekte bereits entschlüsselt oder stehen kurz vor ihrer Aufklärung. Mit Untersuchungen auf DNA- und RNA-Ebene allein können jedoch nicht alle Fragestellungen nach der Funktion der Genprodukte beantwortet werden. Das Proteom gibt besser noch als das Transkriptom ein direktes Bild der Aktivität einer Zelle wieder, wofür im Wesentlichen folgende Gründe verantwortlich sind: (i) Eine hohe Transkriptionsrate bedeutet nicht unbedingt eine große Menge an mRNA im Cytoplasma, welche abhängig ist vom Transport der mRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma und von der Stabilität der mRNA. (ii) Die Translation von mRNAs kann auf unterschiedliche Weise reguliert werden, wodurch eine mRNA häufig, eine andere mRNA aber selten translatiert wird. (iii) Proteinsynthese, -stabilität und -abbau können abhängig von der Stoffwechsel- oder Umgebungsbedingung sehr unterschiedlich sein. (iv) Proteine können posttranslational modifiziert werden. (v) Proteomanalysen geben Auskunft über die Lokalisation eines Proteins. Somit liefern Untersuchungen auf Proteinebene ergänzende Erkenntnisse über die Komplexität der Vorgänge in einer Pflanze und helfen dabei, Mechanismen der Zellregulation, die auf Proteinebene stattfinden, besser zu verstehen.

Das Proteom ist, anders als das Genom, nicht statisch, sondern ein sehr dynamisches System, das durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst wird. Genau dieses dynamische System bereitet die Schwierigkeit, Proteome zu erfassen, denn der Begriff Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder

eines Organismus unter genau definierten Bedingungen. Von der Probenvorbereitung bis zur Proteintrennung müssen alle experimentellen Schritte konstant gehalten werden, um die quantitativen Verhältnisse in der Zelle nicht zu verändern. Trotz der Schwierigkeiten hat die Proteomanalyse in den letzten Jahren in der Forschung immer mehr an Bedeutung gewonnen. Grund dafür sind Verbesserungen in der Technik der 2D-Gelelektrophorese, zum Beispiel durch die Entwicklung von immobilisierten pH-Gradienten (Bjellqvist et al., 1982), die in unterschiedlichen pH-Bereichen erhältlich sind, von neuen Proteinnachweismethoden wie bei der zweidimensionalen differenziellen Gelelektrophorese (2D-DIGE) (Unlü et al., 1997; Tonge et al., 2001; Marouga et al., 2005), von geeigneten Softwares zur Auswertung von 2D-Gelen sowie von alternativen Auftrennungsmethoden wie zum Beispiel die der 2D *high performance liquid chromatography* (HPLC). Auch eine technische Verbesserung der Massenspektrometrie, die eine Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen ermöglicht, trägt zum Erfolg bei. Neue Sequenzinformationen, die in DNA- und Proteindatenbanken zur Verfügung stehen, haben einen weiteren Anteil an der verbesserten Proteomanalytik.

Änderungen auf Proteinebene als Antwort auf anaeroben Stress wurden bereits untersucht. Sachs et al. (1980) waren die ersten, die über 2D-Gelelektrophorese in Maiswurzeln einen subtraktiven Ansatz verfolgten, um Proteine zu analysieren, die als Antwort auf Anaerobiose reguliert waren. Nach einer Stunde Anoxie kam die Synthese von aeroben Proteinen zum Stillstand, während circa 20 anaerobe Proteine nach zwei Stunden Anoxie neu synthetisiert wurden. Die meisten dieser induzierten anaeroben Polypeptide (ANPs) wurden als Enzyme identifiziert, die im Zuckermetabolismus, an der Glykolyse und der Gärung beteiligt sind, und deren Synthese sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene reguliert ist (Kelley und Freeling, 1984; Hoffmann et al., 1986; Kelley, 1989; Russell und Sachs, 1989). Chang et al. (2000) untersuchten den Einfluss einer Akklimatisierung an anoxische Bedingungen durch eine hypoxische Vorbehandlung in Wurzelspitzen von Maiskeimlingen. Proteine wurden mit [³⁵S]-Met markiert und über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine hypoxische Behandlung von vier Stunden mit 3% Sauerstoff führte zu einer Unterdrückung fast aller normoxischen Proteine. Nur sieben Proteine, darunter die ADH waren als Antwort auf Hypoxie hochreguliert.

In Reis wurden ebenfalls bereits Proteomanalysen durchgeführt, jedoch stand, wie auch in Mais, die anaerobe Stressantwort, zumeist in Koleoptilen, im Fokus (Mujer et al., 1993; Chang et al., 2000). Bisher wurden in Reis keine Proteomanalysen durchgeführt, die zum Ziel hatten, Proteinänderungen als Antwort auf Hypoxie zu untersuchen.

1.5 Zielsetzung

Sauerstoffmangel ist ein abiotischer Stressfaktor, der das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen negativ beeinflusst. Hypoxie wird in der Natur oftmals durch Überflutung ausgelöst. Hypoxische Bedingungen führen zu einer Anreicherung von Ethylen in der Pflanze (Kende et al., 1998). Bei flutungstoleranten Pflanzen kommt Ethylen bei der Steuerung von morphologischen und metabolischen Anpassungen an Sauerstoffmangelbedingungen eine bedeutende Rolle zu (Métraux und Kende, 1983; Voeselek et al., 1997; Drew et al., 2000; Xu et al., 2006). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, welche molekularen Änderungen in zwei unterschiedlich gut angepassten Pflanzen, Tiefwasserreis (*Oryza sativa* L.) und *Arabidopsis thaliana* (L.), zur Anpassung an hypoxische Bedingungen beitragen.

Um Proteine zu identifizieren, die als Antwort auf Sauerstoffmangel reguliert werden, sollte in Reis ein subtraktiver Proteomansatz durchgeführt werden. Zunächst sollten die Methoden der 2D-Gelelektrophorese und der 2D-HPLC etabliert werden. Über den Vergleich der Proteinmuster aus Geweben von nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen sollten Proteine identifiziert werden, die im jüngsten Internodium, das auf Hypoxie mit schnellem Streckungswachstum reagiert, reguliert sind.

In *Arabidopsis* wurde von Klok et al. (2002) ein *Microarray Screening* durchgeführt, um differentiell regulierte Gene als Antwort auf Hypoxie zu identifizieren. Unter diesen Genen befanden sich vier AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren, *AtRAP2*, *AtRAP2.2*, *AtRAP2.3* und *AtDREB2A*, sowie der Transkriptionsfaktor *AtMYB96*. Da AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren abiotische Stressantworten vermitteln, sollte über Genexpressionsanalysen überprüft werden, welche dieser Transkriptionsfaktoren innerhalb von maximal zwei Stunden als Antwort auf Hypoxie induziert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob, und wenn ja, welche regulatorischen Funktionen diese Transkriptionsfaktoren in der Hypoxieantwort besitzen. Aufgrund der frühen Regulation von *AtRAP2.2* sollte schließlich dessen Funktion mit Hilfe von Überexpressionslinien, T-DNA-Insertionslinien und Promotor-GUS Linien näher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

ABC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ACC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ACHC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe, Deutschland
6-Amino-hexansäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	VWR, Darmstadt, Deutschland
BSA (Albumin bovine fraction V)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Calciumchlorid	Serva, Heidelberg, Deutschland
CHAPS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloralhydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	VWR, Darmstadt, Deutschland
Coomassie-Brilliant-Blue-G250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-Sorbitol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextran T-40	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA, Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elutionspuffer	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll™ PM400	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Fischsperma-DNA	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid, 40%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
IAA	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Iminodiacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>IPG-Cover Fluid</i>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
IPG Puffer (pH 4-7 und 3-10 NL)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Isopropanol	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	USB Corporations, Cleveland, OH, USA
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
MOPS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MS Medium	Duchefa, Haarlem, Niederlande
NAD	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NADH-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochloritlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
n-Octylglucosid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Percoll	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Phenol (Roti-Phenol zur DNA/ RNA Isolierung)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>ortho</i> -Phosphorsäure, 85%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PVP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Rifampicin	Fluka (Sigma-Aldrich), Buchs SG, Schweiz
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, 37% (w/v)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silwet L-77	Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Startpuffer für 2D-HPLC	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
SYPRO Ruby	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TCEP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TFA	Fluka (Sigma-Aldrich), Buchs SG, Schweiz
Thioharnstoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRI-Reagent™	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
X-Glucuronidase	Duchefa, Haarlem, Niederlande
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Enzyme

ADH aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (7,5 KU)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Invitrogen, Mount Waverly, Australien
Bovines Trypsin	Roche, Mannheim, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Mount Waverly, VIC, Australien
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail for general use	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
RQ1 RNase-freie DNase (1 U/μl)	Promega, Annandale, NSW, Australien
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland oder Fermentas, Murarrie, QL, Australien
ThermoScript™ Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland oder

(15 U/µl)

Invitrogen, Mount Waverly, VIC, Australien

2.1.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

α -[³² P]-dCTP	Hartmann Analytik, Braunschweig, Deutschland
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
<i>DNeasy Plant Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA Standard <i>Smart Ladder</i>	Eurogentec, Seraing, Belgien
Healthcare GFX™ PCR <i>Purification Kit</i>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Hybond™-N+	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
<i>IPG-DryStrips</i>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Micropore-Tape	Eydam, Kronshagen, Deutschland
MicroSpin™ S-300 Säule HR	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Proteinstandard <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
<i>Plasmid Purification MIDI JETstar Kit</i>	Genomed, Löhne, Deutschland
<i>Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP) Kit</i>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Whatman Papier	Whatman International Ltd., Maidstone, England
ZipTipC18	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Das in den Versuchen verwendete Wasser stammte aus einer SG-Reinstwasser System Anlage (SG-Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Hamburg, Deutschland). Rotisolv HPLC Gradient Grade Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde für die 2D-HPLC Anlage verwendet.

2.1.4 Pflanzenmaterial

Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.), Ökotyp Columbia und C24 wurden von GABI-KAT (Max-Planck-Institut Köln, Deutschland) bezogen. Samen der *AtRAP2.2*-T-DNA Insertionslinien SAIL_184_G12 und SALK_079603 von *Arabidopsis thaliana* (L.), Ökotyp Columbia wurden beim SALK-Institut (La Jolla, CA, USA) bestellt. Die Ethylensignalmutanten *ctr1*, *ein2* und *ein3* von *Arabidopsis thaliana* (L.), Ökotyp Columbia, stammten vom Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, Ohio State University, Columbus, OH, USA). Die $P_{AtRap2.2}$:GUS Linien sowie die *AtRAP2.2* Überexpressionslinien wurden während eines Forschungsaufenthaltes in Zusammenarbeit mit Dr. Rudy Dolferus und Dr. Iain Wilson (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien) generiert. Saatgut der Tiefwasserreissorte

Oryza sativa L. spp. indica cv. Pin Gaew 56 wurden vom International Rice Research Institute (IRRI, Los Baños, Philippinen) bezogen.

2.1.5 Bakterienstämme und Vektoren

Klonierungen wurden mit transformationskompetenten *Escherichia coli* DH5 α -Zellen durchgeführt. Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* (L.) erfolgte mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL1 (Lazo et al., 1991). Für die Infektion von Kalli zur Generation von Wurzelkulturen von *Arabidopsis* wurde der *Agrobacterium rhizogenes* Stamm A4RS verwendet.

Tabelle 1: Dargestellt ist eine Übersicht der verwendeten Vektoren und der Selektionsantibiotika.

Vektor	Verwendung	Selektionsantibiotika
pGEM T-Easy	Eingangsvektor	Ampicillin
pART7	Primärer Vektor (CaMV35S)	Ampicillin
pART27	Binärer Vektor	Kanamycin; Spectinomycin
pHW9	Primärer Vektor (GUS)	Ampicillin
pBIN19	Binärer Vektor	Kanamycin

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2: Dargestellt ist eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Primername	Sequenz (5' → 3')
AtAdh1 Sonde F	GATTGTTGAGAGTGTGGAG
AtAdh1 Sonde R	CTTGGTCGAATCTTTAGAGT
AtRAP2.2 EcoRI F	GAATTCATGTGTGGAGGAGCTATAATCTCCGATTT
AtRAP2.2 BamHI R	GGATCCTAAGGAACCATCGATCACTTCAAAAGTC
AtRAP2.2 Promotor F	GAATTCCAATATTGCCACTCCATGATAA
AtRAP2.2 Promotor R	ATAGCTCCTCCACCCATGGTGGCTTCACGA
AtRAP2.2 Sonde F	CCTAGCGTCGTATCCCAGAA
AtRAP2.2 Sonde R	CAAGGCGTTGTCAAGGTATGC
AtRap2.3 Sonde F	GGCGAAGAAGGTCTGCGTTG
AtRap2.3 Sonde R	CCATCTAAGAACTAATAATACCAC

AtRap2.12 Sonde F	CGAGACACCTTACAACAACAC
AtRap2.12 Sonde R	CAGATGAGAGGTTCAAACACAT
AtRAP2 RT-PCR F	ATGACAACTTCTATGGATTTTTAC
AtRAP2 RT-PCR R	CGGTAGTTTCACTGCGACGGTTG
AtRAP2.2 RT-PCR F	CTCCGATTTACATACCTCCGCCG
AtRAP2.2 RT-PCR R	GTTTCTGGGATACGACGCTA
AtRAP2.3 RT-PCR F	GAATTCATGTGTGGCGGTGCTATTATTTCCGATT
AtRAP2.3 RT-PCR R	GGATCCTTTTACTCATACGACGCAATGACATCATC
AtMYB96 RT-PCR F	GAATTCAGAATGGGAAGACCACCTTGCTGTGAA
AtMYB96 RT-PCR R	GGTACCTAGAACTAGAACATCCCTTCTTGTCCTGC
AtDREB2A RT-PCR F	CAGAGTGGAGATAGAAACAGAAC
AtDREB2A RT-PCR R	AGGTATTCCGTAGTTGAGGCTTTG
Cyclophilin	TGGACCAGGTGTACTTTCAATGG
Cyclophilin	CCACTGTCTGCAATTACGACTTTG
Salk LB1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
Salk LB2	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
35S F	AAGGATCTGAGCTACACATGC
35S R	CCTTCGCAAGACCCTTCCTCT

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* (L.)

Die Versuche wurden mit dem Ökotyp Columbia-0 durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Hypoxietoleranz von *Arabidopsis* Ökotypen wurde für einige Versuche zusätzlich der Ökotyp C24 verwendet. Die Anzucht von *Arabidopsis* erfolgte in einem 1:1 Sand/Humus-Gemisch. Für eine gleichmäßige Keimung wurden die *Arabidopsis*samen bei 4°C für 48 Stunden im Dunkeln stratifiziert, anschließend in eine Klimakammer überführt und unter Langtagbedingungen mit einem Tag/Nachtrhythmus von 16 Stunden Licht (70 μM Photonen/ m^2s) bei 22°C kultiviert. Zur Transformation von *Arabidopsis* wurden circa 15 Samen in einem Topf (\varnothing 10 cm) ausgesät. Der Topf wurde mit einem Netz abgedeckt, um beim späteren Tauchen der Pflanzen zu verhindern, dass die Erde aus dem Topf fällt. Für Promotor-GUS Analysen und Wachstumsversuche wurden vier Tage alte, im Licht oder im Dunkeln angezogene Keimlinge verwendet. Für Sterilexperimente wurden die Samen zunächst in 0,5%iger (v/v) Natriumhypochloritlösung für 20 Minuten oberflächensterilisiert und fünf Mal in autoklaviertem bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die

Samen auf 0,5fachem Murashige und Skoog (MS) Medium (Murashige und Skoog, 1962) (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), mit 1,5% (w/v) Saccharose und 0,8% (w/v) Agarose angezogen. Die Platten wurden mit Micropore-Tape verschlossen. Für die Behandlungen mit Ethyleneffektoren (2.3.2) wurden die Pflanzen zwei Tage vorher in flüssiges MS Medium überführt, damit sie die Effektoren leichter aufnehmen konnten. Für Ethylenmessungen (2.5) wurden die Pflanzen nach einer Woche von MS Medium mit 1,5% (w/v) Saccharose und 0,8% (w/v) Agar auf MS Medium mit 1,5% (w/v) Saccharose und 2% (w/v) Agarose überführt, um die Pflanzen unverletzt vom Medium in die Messgefäße überführen zu können (Peng et al., 2001). Standardmäßig wurden jeweils fünf Samen auf einer Petrischale (\varnothing 60 mm) mit 9,5 ml Medium vertikal angezogen. Für Wachstumsexperimente mit Keimlingen (2.4) wurden jeweils 25 Samen des Wildtyps und 25 Samen einer *AtRAP2.2*-Überexpressionslinie auf eine MS-Platte (\varnothing 92 mm) ausgelegt.

2.2.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* (L.) Wurzelkulturen

Die Herstellung und die Transformation von Arabidopsiswurzelkulturen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Valvekens et al. (1988). Blätter der zu transformierenden Pflanzen wurden in kleine Fragmente geschnitten und in *callus induction* Medium (CIM) für drei bis vier Tage im Dunkeln inkubiert. Erhaltene Kalli wurden mit dem *Agrobacterium rhizogenes* Stamm A4RS infiziert, der das Wildtyp Ri-Plasmid enthält. Wurzelkulturen wurden in Petrischalen (\varnothing 92 mm) mit 15 ml flüssigem MS-Medium (0,5fach MS, 3% (w/v) Saccharose und 0,5 g/l MES) kultiviert, welches alle zehn bis 14 Tage gewechselt wurde. Die Petrischalen wurden mit Micropore Tape verschlossen und im Dunkeln auf einem Schüttler mit 50 rpm bei 22°C kultiviert.

2.2.3 Anzucht von *Oryza sativa* (L.)

Für die Anzucht von Reispflanzen, *Oryza sativa* spp. indica cv. Pin Gaew 56, wurden die Karyopsen auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen für vier Tage bei 27°C im Dunkeln vorgekeimt. Anschließend wurden jeweils zwei Keimlinge in einem Topf ausgesät, der mit einem Gemisch aus Pikiererde/Lava-Basalt (2:1) gefüllt war. Die Anzucht erfolgte in den ersten sechs Wochen im Gewächshaus bei einer Nachttemperatur von circa 20°C und einer Tagstemperatur von circa 27°C, 14 Stunden Licht (von durchschnittlich 100 bis 300 μM Photonen/ m^2s) und 70% relativer Luftfeuchte. Die weitere Anzucht wurde in Klimakammern bei 27°C, 16 Stunden Licht (300 μM Photonen/ m^2s) und einer achtstündigen Dunkelperiode sowie bei 70% relativer Luftfeuchte durchgeführt. Bewässert wurden die Pflanzen

durchgängig mit einer 0,1%igen (w/v) Wuxal N 12-4-6 Düngerlösung mit 12% (v/v) Stickstoff, 4% (w/v) P₂O₅, 6% (w/v) K₂O und Spurenelementen (Aglukon, Düsseldorf, Deutschland).

2.3 Stressbehandlungen von Arabidopsis und Reis

2.3.1 Sauerstoffmangelversuche an Arabidopsis

Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Sauerstoffmangelversuche steril angezogene vier Tage alte Keimlinge, 2,5 Wochen alte Pflanzen oder Wurzelkulturen mit 5% O₂, 0,04% CO₂ und 94,96% N₂ für die jeweils angegebenen Zeitpunkte im Dunkeln begast. Die Gaszusammensetzung wurde über einen Durchflussmesser mit Schwebekörper für Gase (Aalborg, Orangeburg, USA) eingestellt. Die Begasung erfolgte in bis zu vier gasdichten Zylindern mit je einem Volumen von 2 l, die über gasdichte Schläuche hintereinander verbunden waren. Der Gasfluss wurde kontrolliert, indem er abschließend durch ein wassergefülltes Gefäß geleitet wurde. Über Gaschromatographie (GC) wurde zusätzlich die Gaszusammensetzung überprüft. Die Begasung erfolgte zu Beginn der Inkubation für zehn Minuten und dann bei Kurzzeitbehandlungen stündlich sowie bei Langzeitbehandlungen alle zwei Stunden für jeweils zehn Minuten mit einer Durchflussrate von 1 l/min. Für Sauerstoffmangelversuche wurden pro Versuchszeitpunkt fünf bis sechs Petrischalen verwendet, wodurch sich eine Gesamtanzahl von 25 bis 30 Pflanzen pro Zeitpunkt ergab. Nach den Sauerstoffmangelbehandlungen wurden Spross und Wurzel der Pflanzen geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.3.2 Ethylen- und Ethyleninhibitorbehandlungen an Arabidopsis

Zu behandelnde Pflanzen wurden zwei Stunden vor Beginn der Sauerstoffmangelversuche mit Ethyleneffektoren oder Ethyleninhibitoren vorinkubiert. Als Effektoren wurden Ethephon oder der Ethylenvorläufer 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC), als Inhibitoren Silberthiosulfat (STS), Cobaltchlorid (CoCl₂) oder 1-Methylcyclopropan (1-MCP) verwendet. STS wurde in einem 1:1 Verhältnis aus 100 mM Natriumthiosulfat und 100 mM Silbernitrat frisch angesetzt. Die Konzentration der Effektoren betrug für 1-MCP 1 ppm und 50 µM für alle anderen Effektoren. Behandlungen mit 1-MCP wurden in einem Exsikkator durchgeführt.

2.3.3 Partielle Überflutung von Tiefwasserreis

Ein Tank mit einem Fassungsvermögen von 700 l wurde in einer Klimakammer mit Wasser gefüllt, das auf 25°C erwärmt wurde. Um Überflutungsstress zu simulieren, wurden zehn bis

12 Wochen alte Reispflanzen in dem Tank geflutet, so dass die obersten Blätter einer Pflanze noch circa 30 cm über die Wasseroberfläche hinausragten. Kontrollpflanzen wurden nicht geflutet. Die Versuche wurden bei 27°C im Licht (300 μM Photonen/ m^2s) durchgeführt. Aus dem jüngsten Internodium wurden das interkalare Meristem und ein Teil der Elongationszone geerntet und in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.4 Wachstumsversuche an Arabidopsiskeimlingen

Um zu testen, ob *AtRAP2.2*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp phänotypische Unterschiede nach Sauerstoffmangelbehandlung zeigten, wurden im Licht angezogene und etiolierte Keimlinge verwendet. Von Beginn der Keimung wurden die Keimlinge für vier Tage in Exsikkatoren mit 21% oder 5% Sauerstoff angezogen. Nach Behandlung wurden die Wurzellänge und die Länge des Hypokotyls mit Hilfe eines Olympus SZX9 Stereomikroskops und einer Olympus Color View Digitalkamera (Olympus, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

2.5 Ethylenmessungen über Gaschromatographie (GC)

Die Ethylenproduktion von 2,5 Wochen alten Arabidopsispflanzen, die normoxischen oder hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, wurde mit einem GC-14B Gaschromatographen (Shimadzu, Hamburg, Deutschland) gemessen, um zu überprüfen, ob Sauerstoffmangel die Ethylenbiosynthese beeinflusst. Zusätzlich wurde die Gaschromatographie eingesetzt, um die Sauerstoffkonzentration des Inkubationsraumes der Begasungsanlage zu überprüfen. Jeweils 30 Pflanzen wurden nach entsprechender Sauerstoffmangelbehandlung für 0, 2 oder 8 Stunden (2.3.1) in ein gasdichtes Gefäß überführt, dessen Volumen 22 ml betrug. Nach Bestimmung des Frischgewichtes wurden die Gefäße bis zur anschließenden Messung verschlossen. Der Ethylengehalt wurde jeweils nach einer Stunde bestimmt (Peng et al., 2001). Für die Messungen wurde ein Gasvolumen von 500 μl mit einer Hamilton-Spritze entnommen und in den GC injiziert (modifiziert nach Vogel et al., 1998). Als Trägergas diente Helium und als stationäre Phase eine Gepacktsäule mit Haysep Q als Packungsmaterial. Die Detektion von organischen Stoffen wie auch Ethylen erfolgte mit dem Flammenionisationsdetektor. Die Sauerstoffkonzentration wurde über den Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt. Die Retentionszeit von Ethylen wurde mit einem Standard bekannter Konzentration ermittelt und über die *Peak*-Fläche quantifiziert. Die gemessene Ethylenmenge wurde auf das Frischgewicht bezogen.

2.6 Anzucht von Bakterienstämmen

Für Klonierungen wurden transformationskompetente *Escherichia coli* DH5 α Zellen und für die Transformation von Arabidopsispflanzen kompetente Zellen des *Agrobacterium tumefaciens* Stammes AGL1 verwendet. Die Selektion erfolgte durch Rifampicin und Kanamycin. Für die Herstellung von Wurzelkulturen wurden Kalli mit dem *Agrobacterium rhizogenes* Stammes A4RS transformiert, welcher das Wildtyp Ri Plasmid enthält und eine Resistenz gegen Rifampicin und Spectinomycin aufweist. Alle Bakterienstämme wurden sowohl als Oberflächenkultur auf LB Medium nach Luria-Bertani (USB Corporations, Cleveland, Ohio, USA) mit 1,5% (w/v) Agar und den jeweiligen Selektionsantibiotika angezogen, als auch als Suspensionskultur bei 300 rpm bei entweder 37°C (*E. coli*) oder 28°C (*A. tumefaciens* und *A. rhizogenes*).

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von DNA

2.7.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* (L.)

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden zwei Methoden angewandt: (i) Für die schnelle Überprüfung auf Homozygotie von T-DNA Insertionslinien wurde ein Blatt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 400 μ l Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS) versetzt. Anschließend wurde das Blatt mit einem Mikropistill gemörsert und für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA mit 300 μ l Isopropanol gefällt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 13000 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 100 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen. (ii) Für eine saubere DNA-Aufreinigung wurde das *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll verwendet.

2.7.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das *Plasmid Purification MIDI JETstar Kit* (Genomed, Löhne, Deutschland) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Plasmid-DNA wurde für Klonierungen zur Herstellung von transgenen Pflanzen (2.7.8) und für die Herstellung von Sonden für Northern Blot Analysen (2.8.2) benötigt.

2.7.1.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA wurde aus Agarose-Gelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll aufgereinigt. Die Größe und Konzentration der DNA-Produkte wurde über DNA-Gelelektrophorese mit Hilfe eines Größen- und Mengenmarkers (2.7.7) bestimmt.

2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Arabidopsis

Gesamt-RNA wurde für Expressionsanalysen über semiquantitative PCR (2.7.6) sowie über Northern Blot Analysen (2.8.2) benötigt. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde TRI-Reagent™ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörkert und anschließend wurden 100 mg des Materials mit 1 ml Tri-Reagent versetzt. Die RNA wurde nach den Angaben des Herstellers isoliert. Je nach Größe des RNA-Pellets wurde es in 30 bis 100 µl Wasser aufgenommen und nachfolgend die Konzentration bestimmt (2.7.3).

2.7.3 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Nukleinsäuren wurden photometrisch mit einem Spektralphotometer (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bei einer optischen Dichte (OD) von 260 und 280 nm gemessen. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Anhand des Absorptionsquotienten von 260 zu 280 nm wurde die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt.

2.7.4 DNA-Sequenzierungen

Um die klonierten Sequenzen auf Richtigkeit und auf Insertionsrichtung zu überprüfen, wurden entsprechende Plasmidabschnitte nach der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977) in der Sequenzierabteilung am CSIRO Plant Industry (Canberra, Australien) oder von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) sequenziert und anschließend analysiert (2.10).

2.7.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Genomische DNA oder cDNA Fragmente wurden über PCR in einem PTC-200 Thermalcycler (MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) amplifiziert. Folgende Bedingungen wurden für die Amplifizierung gewählt:

1. Initiale Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten

2. Denaturierung für jeden Amplifikationszyklus bei 94°C für 40 Sekunden
3. Anlagerung der Oligonukleotide bei berechneter Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer für 40 Sekunden
4. Elongation bei 72°C mit 1 Minute/1 kb für *Taq*-Polymerase und 1,5 Minuten/1 kb für *Pfu*-Polymerase
5. Abschluss der Elongation bei 72°C für 5 Minuten
6. Kühlung bei 4°C

2.7.6 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Nach der RNA Extraktion wurden die RNA-Proben vor der Konzentrationsbestimmung mit RQ1 RNase-freier DNase (1 U/μl) (Promega, Annandale, Australien) nach Angaben des Herstellers verdaut. Die Fällung der RNA fand mit 1/10 Volumen 10 M LiCl über Nacht bei 4°C statt. Die cDNA Synthese mit dem Enzym Reverse Transkriptase erfolgte nach dem ThermoScript Protokoll (Invitrogen, Mount Waverley, Australien) nach Angaben des Herstellers.

2.7.7 DNA-Gelelektrophorese

Die Größe von DNA-Fragmenten wurde über Gelelektrophorese bestimmt. Abhängig von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente wurde der Agarosegehalt von 0,8% (w/v) bis zu 2% (w/v) variiert. 1/10 des Probenvolumens wurde an Ladepuffer (0,1% (w/v) Bromphenolblau und 50% (w/v) Glycerin) zu den Proben gegeben. Der DNA Standard *Smart Ladder* (Eurogentec, Seraing, Belgien) wurde zur Größen- und Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8 und 0,11% (v/v) Eisessig) bei 100 mA aufgetrennt.

2.7.8 Herstellung von transgenen Pflanzen

2.7.8.1 Herstellung von *AtRAP2.2* Promotor-GUS Linien

Ein 1112 bp langes Fragment vom 5' untranslatierten Bereich des Startcodons von *AtRAP2.2* wurde als *AtRAP2.2* Promotorsequenz über PCR (2.7.5) mit den angegebenen Primern (Tabelle 2) aus Wildtyp-DNA amplifiziert. Das Fragment wurde zunächst in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega, Annandale, Australien) kloniert. Die *AtRAP2.2* Promotorsequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NcoI vor die GUS-

NOS Kasette des Vektors pHW9 kloniert (Bevan, 1984). Anschließend wurde die gesamte Kasette als EcoRI und XbaI Fragment in den binären Vektor pBIN19 kloniert (Bevan, 1984).

2.7.8.2 Herstellung von *AtRAP2.2* Überexpressionslinien

Als Ausgangsvektor für weitere Klonierungen und auch als Vorlage für die Herstellung einer *AtRAP2.2* DNA-Sonde (2.8.2.1) wurde *AtRAP2.2* cDNA und genomische DNA zunächst in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega, Annandale, Australien) kloniert. Für die Primersynthese wurden an das 5' Ende des 5'→3' Oligonukleotids eine EcoRI und an das 5' Ende des 3'→5' Oligonukleotids eine BamHI Schnittstelle angefügt (2.1.6). Für die PCR wurde genomische DNA (2.7.1.1.) oder cDNA des Wildtyps als Template eingesetzt. Das jeweilige PCR Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.7.7), anschließend aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (2.7.1.3). Die Ligation in den Vektor pGEM-T-Easy wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Das Ligationsprodukt wurde transformiert (2.7.10.1) und aus positiven Kolonien Plasmid-DNA isoliert (2.7.1.2), welche abschließend sequenziert (2.7.4) wurde.

Für die Herstellung von Überexpressionslinien wurde der primäre Klonierungsvektor pART7 und der binäre Vektor pART27 verwendet (Gleave, 1992). Die genomische *AtRap2.2* Sequenz mit den flankierenden Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI wurde zwischen den 35S Promotor und die 3' NOS Terminationssequenz des Plasmides pART7 kloniert. pART7 als auch der binäre Vektor pART27 verfügen über eine NotI Schnittstelle. Beide Vektoren wurden mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten und vor der Ligation mittels Alkalischer Phosphatase (Invitrogen, Mount Waverley, Australien) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Das Konstrukt wurde für die *AtRAP2.2* Überexpression in Arabidopsis verwendet.

2.7.9 Herstellung von kompetenten Zellen

2.7.9.1 Herstellung von transformationskompetenten *Escherichia coli* DH5α-Zellen

Zur Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* DH5α-Zellen wurde eine frische Übernachtskultur auf einem entsprechenden Selektionsmedium angezogen. Eine Einzelkolonie wurde entnommen, in 5 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 1:100 verdünnt, in 500 ml LB gegeben und so lange geschüttelt bis die Kultur eine OD₆₅₀ von 0,5 bis 1 erreichte. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und bei 3000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 125 ml Volumen kalter 0,1 M MgCl₂ Lösung aufgenommen und in

einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm für 5 Minuten bei 4°C pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden dann in 125 ml kalter 0,1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm für 5 Minuten bei 4°C wurden die Pellets in 25 ml kalter 0,1 M MgCl₂ Lösung mit 15% (v/v) Glycerin gelöst und in 200 µl Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.7.9.2 Herstellung von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 Zellen wurde eine frische Übernachtskultur auf LB Medium mit Rifampicin bei 28°C für 2 Tage kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde entnommen und in 200 ml LB mit 200 µl Rifampicin (50 mg/ml) gelöst. Die Kultur wurde geschüttelt bis sie eine OD₆₅₀ von 0,5 bis 1 erreicht hatte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 Minuten bei 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und in 200 ml 1 mM HEPES-KOH, pH 7,0 resuspendiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 100 ml sterilem 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, zentrifugiert und abschließend in 750 µl 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. 50 µl Aliquots wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.7.10 Transformation von Bakterien

2.7.10.1 Hitzeschock-induzierte Transformation von *Escherichia coli*

Ein 200 µl Aliquot von transformationskompetenten *E. coli* DH5α Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 0,5 bis 1 µg des zu transformierenden Plasmids gegeben und für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte über einen Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden. Anschließend wurden 200 µl LB Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt und auf MS Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert.

2.7.10.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 Zellen durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurde das zu transformierende Plasmid und ein 50 µl Aliquot von elektrokompetenten AGL1 Zellen auf Eis aufgetaut. 0,5 -1 µg Plasmid wurden zu den Zellen gegeben und in eine Küvette transferiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2 Volt. Anschließend wurde 1 ml LB Medium hinzugefügt und die Zellen bei 28°C für 4 Stunden geschüttelt. Je 10 µl und 40 µl wurden auf LB-Platten mit dem Selektionsantibiotikum

Rifampicin des *A. tumefaciens* Stammes und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum des Vektors ausplattiert und bei 28°C kultiviert.

2.7.11 Transformation von Arabidopsis

Transformierte Agrobakterien wurden in 3 ml flüssigem LB-Medium mit den entsprechenden Selektionsantibiotika bei 28°C und 300 rpm angezogen. 0,5 bis 1 ml dieser Vorkultur wurden verwendet, um eine 500 ml Kultur anzupfen. Nachdem die Bakterien die gewünschte Dichte erreicht hatten, wurden sie bei 3000 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 50 ml einer Infiltrations-Lösung bestehend aus 5% (w/v) Saccharose, 0,5fach MS und 0,03% (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA) resuspendiert. Die Blüten der zu transformierenden Pflanzen wurden kurz in die Bakterienlösung getaucht und anschließend mit Folie leicht umwickelt. Die Samen dieser Pflanzen wurden circa 8 Wochen später geerntet und auf einem entsprechenden Selektionsmedium ausgebracht.

2.8 Expressionsanalysen

2.8.1 Promotor-GUS Expressionsanalysen

Zwei unabhängige transgene $P_{AtRAP2.2}$:GUS Linien wurden auf GUS-Aktivität untersucht. Die GUS-Färbung wurde nach dem Protokoll von Bomblies (2000) durchgeführt. Für die GUS-Analysen wurden 2,5 Wochen alte Pflanzen oder 4 Tage alte sowie im Licht oder Dunkeln angezogene Keimlinge verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit einem Olympus SZX9 Stereomikroskop oder einem Olympus BX41 Mikroskop mit einer Olympus Color View Digitalkamera (Olympus, Hamburg, Deutschland).

2.8.2 Northern-Blot-Analyse

2.8.2.1 Herstellung der DNA-Sonden für *AtRAP2.2*, *AtADH1*, *AtRAP2.3* und *AtRAP2.12*

Mit den aufgeführten Oligonukleotiden (Tabelle 2) wurden DNA-Sonden für *AtRAP2.2*, *AtADH1*, *AtRAP2.3* und *AtRAP2.12* hergestellt. Die DNA-Sonde für *AtRAP2.2* wurde von der *AtRAP2.2* Volllänge cDNA aus dem Plasmid pGEM-T-Easy amplifiziert. Für die Amplifizierung der *AtADH1* DNA-Sonde wurde der Vektor pAr mit der genomischen Sequenz von *AtADH1* von Dr. Rudy Dolferus (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien) zur Verfügung gestellt. Die DNA-Sonden für *AtRAP2.3* sowie *AtRAP2.12* wurden über PCR aus Wildtyp cDNA mit der *pfu* Polymerase amplifiziert. Alle PCR Produkte wurden über eine

Säule (Healthcare GFX™ PCR Purification Kit, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) aufgereinigt und bei -20°C gelagert. Die Konzentration und die Größe des amplifizierten Fragmentes wurden über einen Größen- und Mengenstandard auf einem 0,8%igen (w/v) Agarosegel bestimmt. Die DNA-Sonden für *AtRAP2.3* und *AtRAP2.12* wurden zusätzlich durch einen Restriktionsverdau überprüft. Alle zu amplifizierenden Bereiche wurden vorher über BLAST-Suche (2.10) auf ihre Spezifität getestet. Die Länge der Sonden betrug für *AtRAP2.2* 446 bp, für *AtADH1* 464 bp, für *AtRAP2.3* 451 bp und für *AtRAP2.12* 475 bp. Folgende Bereiche ab dem Startcodon gerechnet, wurden von der cDNA amplifiziert: bei *AtRAP2.2* von nt 565 bis nt 1011, bei *AtADH1* von nt 219 bis nt 703, bei *AtRAP2.3* von nt 477 bp bis nt 928 bp und bei *AtRAP2.12* von nt 933 bp bis nt 1408. Für die Amplifizierung wurde ein Bereich ausgewählt, der keine Introns enthielt.

2.8.2.2 RNA Gelelektrophorese

Nach der Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben wurden 20 µg RNA in einem Volumen von 50 µl aufgenommen und anschließend in einem Volumen 1 M NaCl-Lösung und 2,5 Volumen 100% (v/v) Ethanol gefällt. Die Fällung erfolgte bei -20°C über Nacht. Die Proben wurden am folgenden Tag für 15 Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 µl Probenpuffer (1x MOPS (40 mM MOPS, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA), 40% (v/v) Formamid, 5% (v/v) Formaldehyd, 5% (v/v), Farbstoff bestehend aus 50% (v/v) Glycerin und 0,004% (w/v) Bromphenolblau, 3 µl/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml)) resuspendiert. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde die Probe für 5 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend in einem Formaldehyd-Agarosegel (1% (w/v) Agarose, 18% (v/v) Formaldehyd, 1x MOPS) bei 80 Volt in 1x MOPS-Laufpuffer aufgetrennt.

2.8.2.3 RNA-Transfer

Nach der Gelelektrophorese wurde die RNA kapillar auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) transferiert. In 10x SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat) getränktes Whatman-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) diente als Transferbrücke. Auf die Brücke wurde das Gel und auf das Gel die Membran gelegt. Es folgten zwei Schichten Whatman-Papier und ein circa 10 cm hoher Stapel Saugpapier, welcher mit einer Glasplatte und zusätzlichem Gewicht beschwert wurde. Der kapillare Transfer der RNA aus dem Gel auf die Membran erfolgte in 10x SSC über Nacht. Die RNA wurde mit der Membran durch UV-Crosslinking (Hoefer Inc., San Francisco, USA) verbunden und anschließend in 2x SSC gewaschen und bei -80 °C eingefroren.

2.8.2.4 Strippen der Membran

Bereits hybridisierte Membranen wurden zum Strippen in 1% (w/v) SDS Lösung bei 99°C für wenige Minuten gewaschen bis kein Signal mehr detektiert werden konnte. Dieser Schritt war erforderlich, um die gebundene radioaktiv markierte DNA der vorherigen Hybridisierung von der Membran zu entfernen.

2.8.2.5 Hybridisierung der Membran

Die Membran wurde mit der RNA-beladenen Seite nach innen in eine Hybridisierungsröhre gerollt. Prähybridisierungslösung (5% (w/v) Dextransulfat, 1% (w/v) SDS, 1 M NaCl) wurde auf 68°C erhitzt und mit 0,1 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA versetzt. 20 ml Prähybridisierungslösung wurden in eine Hybridisierungsröhre gegeben, in der die Membran für 4 Stunden bei 68°C inkubiert wurde.

2.8.2.6 Markierung der cDNA mit α -[³²P]-dCTP

Für die Markierung von cDNA mit α -[³²P]-dCTP wurden 25-50 ng in einem Volumen von 47 μ l aufgenommen, denaturiert, 3 μ l mit 30 μ Ci α -[³²P]-dCTP versetzt und zu einem *Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP) Kit* (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gegeben. Neunmer Zufallsoligonukleotide, dNTPs, Klenow-Fragment und Puffer generierten eine DNA-Sonde mit α -[³²P]-markierten dCTPs bei 37°C innerhalb von 15 Minuten. Nicht inkorporiertes α -[³²P]-dCTP wurde über eine MicroSpinTM S-300 Säule HR (GE-Healthcare, Freiburg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers entfernt. Die aufgereinigte Sonde wurde anschließend bei 99°C denaturiert und zu der Prähybridisierungslösung gegeben, in der die Membran über Nacht bei 68°C inkubiert wurde.

2.8.2.7 Detektion der radioaktiv markierten Sonden

Nach Hybridisierung über Nacht wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und die Membran für 10 Minuten bei 68°C im Hybridisierungsofen mit 2x SSC und 0,1% (w/v) SDS gewaschen. Nach diesem Waschschrift folgten zwei weitere Waschschrift mit 1x SSC und 0,1% (w/v) SDS sowie 0,5x SSC und 0,1% (w/v) SDS für jeweils 10 Minuten bei 68°C im Schüttelbad. Anschließend wurden die Signalstärke sowie der Hintergrund mit einem Geigerzähler gemessen, um die Expositionszeit abschätzen zu können und zu testen, ob die Membran lange genug gewaschen wurde. Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und das Signal durch Exposition eines Röntgenfilms (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) detektiert. Die Exposition erfolgte bis zu zwei Wochen bei -80°C. Der Röntgenfilm wurde in

einem automatischen Röntgenfilmentwickler CURIX 60 (AGFA, Köln, Deutschland) entwickelt.

2.9 Methoden zur Proteinanalyse

2.9.1 Aufreinigung von löslichen Gesamtproteinen für die 2D-Gelelektrophorese

Proben für die 2D-Gelelektrophorese durften keine Verunreinigungen enthalten, da diese ansonsten mit der isoelektrischen Fokussierung interferieren und das Ergebnis negativ beeinträchtigen konnten. Deshalb war es essentiell, Salze, Nukleinsäuren, Polysaccharide, Lipide, phenolische und unlösliche Bestandteile zu eliminieren. Für die Probenaufbereitung wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit Extraktionspuffer (100 mM Hepes-KOH, pH 7,5, 5% (w/v) Glycerin, 15 mM EGTA, 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 0,5% (w/v) PVP, 30% (w/v) Saccharose) versetzt. Pro Gramm Pflanzenmaterial wurden 9 ml Extraktionspuffer verwendet. Anschließend wurde die Probe mit einem Glaspotter homogenisiert und bei 90000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem gleichen Volumen Phenol versetzt, gemischt und bei 6800 x g für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, das Volumen bestimmt, mit einem gleichen Volumen Reextraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4, 20 mM KCl, 10 mM EDTA, 0,4% (v/v) β -Mercaptoethanol, 30% (w/v) Saccharose) versetzt, gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Insgesamt wurde dieser Vorgang drei Mal wiederholt, d. h. die Probe wurde drei Mal mit Reextraktionspuffer gewaschen. Die Proteine wurden aus dem erhaltenen Überstand mit 5 Volumen 100 mM Ammoniumacetat in Methanol über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurden die ausgefallenen Proteine bei 10000 x g für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 80% (v/v) Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in einer Speed-Vac CON-1000 (Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland) für 1 bis 2 Minuten getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.9.2 Aufreinigung von löslichen Gesamtproteinen für die 2D-High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Als alternative Methode zur 2D-Gelelektrophorese wurde die Methode der 2D-HPLC genutzt, um Proteine zu identifizieren, die als Antwort auf Überflutung reguliert sind. Bei der 2D-HPLC wurden die Proteine in der ersten Dimension über eine Chromatofokussierungssäule (HPCF = *High Performance Chromato Focussing*) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der

zweiten Dimension über eine *reversed-phase* Säule nach Hydrophobizität aufgetrennt. Die Aufreinigung und Auftrennung der Proben aus Reis über 2D-HPLC erfolgte modifiziert nach dem ProteomeLab™ PF 2D Use Protocol (Beckman Coulter, Darmstadt, Deutschland) von Michael Motzkus (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sauter, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Auf die HPCF Säule wurden 2,5 mg Protein geladen, die in maximal 2 ml Startpuffer gelöst sein durften. Um eine entsprechende Proteinkonzentration in diesem Volumen zu erhalten, wurde nach der Proteinextraktion eine Ethanol-fällung durchgeführt. Nach dem letzten Extraktionsschritt, der aus einer Zentrifugation bestand, wurde der Überstand abgenommen, mit einem dreifachen Volumen -20°C kaltem 100% (v/v) Ethanol versetzt, 30 Minuten bei -20°C gelagert und anschließend für 10 Minuten bei 13000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Proteinpellet in einer Speed Vac getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.9.3 Aufreinigung von Kernproteinen

Als Ausgangsmaterial für die Kernextraktion dienten insgesamt circa 150 zwölf Wochen alte Reispflanzen. Die Kernextraktion wurde nach einem Protokoll von Cox und Goldberg (1988) durchgeführt. Im letzten Schritt des angegebenen Protokolls wurden isolierte Kerne in 400 µl Kernresuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 mM MgCl₂, 50% (v/v) Glycerin) aufgenommen, in dem die Kerne bei -80°C für länger als 1 Jahr gelagert werden konnten. Vor der Proteinextraktion wurden die Kerne zunächst mit 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5 und 330 mM Sorbitol für 5 Minuten bei 13000 x g für 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml TRI-Reagent™ versetzt. Die Proteine wurden nach Angaben des Herstellers extrahiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.9.4 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Methode (Bradford, 1976) zur Messung der Gesamtproteinkonzentration basiert auf einer kolorimetrischen Reaktion zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 und Proteinen. Bei der Bindung von Coomassie-Brillant-Blau an die Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 495 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration der Lösung. Roti-Quant (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde als fertige Bradfordlösung eingesetzt. Zunächst wurde eine Eichreihe mit BSA hergestellt und anschließend die unbekannte Proteinkonzentration der Probe dreifach bestimmt. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml und setzte sich aus 795 µl Wasser, 5 µl Protein und 200 µl Bradford-Lösung zusammen.

2.9.5 Bestimmung der Alkoholdehydrogenase (ADH) Enzymaktivität

Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde auf Eis in Extraktionspuffer (100 mM Tris, pH 8,0, 25% (v/v) Glycerin, 0,8% (v/v) β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) PVP, 5 mM DTT) aufgenommen und bei 15000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (2.9.4) bestimmt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Reaktionspuffer (0,15 M Tris, pH 8,0, 0,3 mM NAD⁺, 0,175% (v/v) Ethanol) gestartet und beruhte auf dem optisch-enzymatischen Test nach Warburg (1935). Photometrisch wurde die Zunahme von NADH+H⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und aus der Steigung die ADH Aktivität berechnet. Negativkontrollen wurden ohne Substrat oder ohne Protein durchgeführt. Für die Messungen wurden 20 μ g Gesamtprotein eingesetzt und in 200 μ l Extraktionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 800 μ l Reaktionspuffer startete die Enzymreaktion. Gemessen wurde alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 2 Stunden.

2.9.6 Auftrennung von Proteinen über 2D-HPLC

Die Auftrennung von Proteinen über 2D-HPLC wurde wie im ProteomeLabTM PF 2D Use Protocol angegeben von Michael Motzkus (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sauter, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) durchgeführt. 2,5 mg Protein wurden in 2 ml Startpuffer aufgenommen und über zwei Dimensionen chromatographisch aufgetrennt. Die erste Dimension unterteilte die Proben in 32 Fraktionen, die jeweils in der zweiten Dimension in 18 Fraktionen aufgeteilt wurden, wodurch sich eine Gesamtmenge von 576 Fraktionen ergab, die in 96 Well Platten gesammelt wurden. Eine durchschnittliche Fraktion enthielt somit im Durchschnitt 4,34 μ g Protein. Anschließend wurden die Proben in einem miVac Quattro Concentrator (Barnstead Genevac, Ipswich Suffolk, UK) gefriergetrocknet. Mit der DeltaVue Software (2.10) wurden die erhaltenen Chromatogramme ausgewertet. Fraktionen, in denen ein Peak mindestens in seiner Höhe um den Faktor 2 zu- oder abnahm, wurden ausgewählt, in 100 μ l Puffer Solubilisierungspuffer (2.9.7) aufgenommen und über SDS-PAGE (2.9.7) in der dritten Dimension aufgetrennt.

Um die Proben für eine kolloidale Coomassie-Färbung anzureichern, wurden aus Kontrollpflanzen und gefluteten Pflanzen isolierte Proteine je 3 Mal in der ersten Dimension aufgetrennt, das heißt, es wurden je 3 Mal 2,5 mg Protein appliziert. Dadurch ergab sich eine Gesamtgröße von 3 Mal 32 Fraktionen. Jede dieser 3 erhaltenen Fraktionen wurde anschließend 3 Mal in der zweiten Dimension in je 18 Fraktionen aufgetrennt. Insgesamt wurde dadurch eine neunfache Proteinanreicherung erzielt.

2.9.7 Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE

Die eindimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte in einem diskontinuierlichen Gel nach Laemmli (1970). Das Sammelgel setzte sich aus 0,625 mM Tris, pH 6,6, 4,8% (v/v) Acrylamid, 0,004% (w/v) APS, 0,0012% (v/v) TEMED zusammen. Das Trenngel hatte eine Acrylamidkonzentration von 12,6% (v/v) und enthielt 1,875 mM Tris, pH 8,8, 0,015% (w/v) APS sowie 0,0015% (v/v) TEMED. Die Proteine wurden bei 95°C für 1 Minute in einem vierfach Solubilisierungspuffer (250 mM Tris, pH 6,8, 40% (w/v) Glycerin, 20% (v/v) β -Mercaptoethanol, 4% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) zur Denaturierung gekocht. Der Proteinstandard *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (14,4 bis 116,0 kDa) stammte von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland). Der Laemmli-Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, pH 8,3, 200 mM Glycerin sowie 0,1% (w/v) SDS.

2.9.8 Auftrennung von Proteinen über 2D-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen über 2D-Gelelektrophorese erfolgte sowohl mit löslichem Gesamtprotein als auch mit Kernproteinen. Für die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension sind immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Gelstreifen für verschiedene pH-Bereiche und in verschiedenen Längen erhältlich (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Um zunächst einen möglichst großen Überblick über das Proteilmuster zu bekommen, wurde ein pH Bereich von 3-10 nicht-linear (NL) ausgewählt. Die Länge des IPG-Streifens betrug 18 cm. Eine zusätzliche Auftrennung erfolgte des Weiteren in einem 18 cm langen IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von 4-7, um die Auflösung zu erhöhen und das Proteilmuster zu spreizen. Vor Beginn der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die getrockneten Proteinpellets zunächst in 400 μ l Rehydrationslösung (8 M Urea, 2% (w/v) CHAPS, 0,002% (w/v) Bromphenolblau, 0,5% (v/v) IPG Puffer, 18 mM DTT) aufgenommen, der Proteingehalt mit der Bradford-Methode (2.9.4) bestimmt und gleiche Proteinmengen auf die Gelstreifen aufgetragen. Abhängig von der anschließenden Färbung der 2D-Gele wurden für eine kolloidale Coomassie-Färbung entweder 750 μ g Protein, für eine Silberfärbung 50 μ g und für eine SYPRO Ruby Färbung 200 μ g Protein eingesetzt, die in einem Volumen von 350 μ l gelöst waren. Für den Auftrag wurden 350 μ l entlang des *StripHolders* (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verteilt. Gelstreifen wurden von der Schutzfolie befreit und mit einer Pinzette mit der Gelseite nach unten auf die Rehydrationslösung gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unter dem Gel befanden und die Probenlösung nicht auf die GelBond-Folie des IPG-Streifens läuft. Anschließend wurden die Gelstreifen mit 1-2 ml *IPG-Cover Fluid* (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) überschichtet, um Verdunstung und Harnstoffkristallisierung zu vermeiden. Die Probe wurde für 12 Stunden rehydriert und anschließend für insgesamt 7 Stunden fokussiert, beginnend

mit einer zunächst steigenden Spannung von 500 V für 1 Stunde, 1000 V für 1 Stunde, 8000 V für 3 Stunden und einer abschließend gleichbleibenden Spannung von 8000 V für 2 Stunden in einer IPGphor II (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Nach der IEF wurden die Gelstreifen in zwei Schritten in einer Equilibrierungslösung (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M Urea, 30% (v/v) Glycerol (87% v/v), 2% (w/v) SDS, 0,002% (w/v) Bromphenolblau) für 15 Minuten gewaschen. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde die Equilibrierungslösung im ersten Schritt mit 64,8 mM DTT versetzt und zur Alkylierung von Thiol-Gruppen in einem zweiten Schritt mit 135 mM IAA. Nach der IEF wurden die Gelstreifen auf ein 12,5%iges SDS-Trenngel überführt und mit einer Agaroselösung (0,5% (w/v) Agarose, 0,002% (w/v) Bromphenolblau, 25 mM Tris, pH 8,3, 200 mM Glycerin sowie 0,1% (w/v) SDS) überschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den beiden Gelen befinden. Über SDS-PAGE wurden die Proteine in der zweiten Dimension in einer Ettan™ DALT six (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) Gelelektrophoresekammer bei 18°C aufgetrennt. Der untere Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris, pH 8,3, 200 mM Glycerin sowie 0,1% (w/v) SDS) war 1x konzentriert, der obere Laufpuffer 2x. Für den Einlauf der Proben in das Gel wurde zunächst eine Spannung von 30 mA/Gel (24 cm x 18 cm) für 30 Minuten angelegt. Die weitere Auftrennung wurde anschließend bei 60 mA/Gel vorgenommen.

2.9.9 Proteinfärbemethoden

2.9.9.1 Kolloidale Coomassie-Färbung

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel für mindestens 1 Stunde in 40% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure fixiert. Anschließend wurde das Gel in einer 80% Färbelösung (2% (w/v) *ortho*-Phosphorsäure (85% (v/v) H₃PO₄), 10% (w/v) Ammoniumsulfat, 0,1% (w/v) CBB-G250) mit 20% (v/v) Methanol über Nacht gefärbt. Die Entfärbung zur Reduktion des Hintergrundes erfolgte durch mehrmaliges Waschen der Gele mit Wasser. Die Nachweisgrenze der kolloidalen Coomassie-Färbung liegt bei 10 ng Protein pro Bande.

2.9.9.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Blum et al. (1987) soll die Identifizierung von Proteinen aus Silbergelen durch Massenspektrometrie ermöglichen. Mit ihr ist der Nachweis von 0,5 ng Protein möglich. Nach dem Gellauf wurden die Proteine im Gel zunächst in 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure für mindestens 1 Stunde fixiert. Danach erfolgte ein

3 x 20 minütiger Waschschrift mit 50% (v/v) Ethanol sowie eine Vorbehandlung in 2 mM Natriumthiosulfat für 1 Minute. Nach 3 Waschschriften in Wasser für je 20 Minuten wurden die Proteine in einer Silbernitratlösung (12 mM AgNO₃, 0,15% (v/v) Formaldehyd) an das Silber gebunden. Das überschüssige Silbernitrat wurde durch gründliches Spülen mit Wasser entfernt. Anschließend wurde das Gel in einer Schale mit Entwicklerlösung (566 mM Na₂CO₃, 0,1% (v/v) Formaldehyd 37% (v/v), 8 µM Na₂SO₃) inkubiert bis das Proteinmuster deutlich zu sehen war. Die Entwicklung wurde durch Überführen in eine Stopplösung (0,05 M EDTA) beendet.

2.9.9.3 SYPRO Ruby Färbung

Die SYPRO Ruby Färbemethode entspricht der Sensitivität einer Silberfärbung und weist zudem die Vorteile auf, nicht überfärbbar, quantifizierbar und massenspektrometrisch kompatibel zu sein. Die Färbung wurde nach dem vom Hersteller (Molecular Probes Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angegebenen Protokoll durchgeführt.

2.9.9.4 Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Stain

Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ermöglicht nach Angaben des Herstellers eine selektive Färbung von phosphorylierten Proteinen in Polyacrylamidgelen. Am effektivsten ist es, den Phosphoprotein Gel Stain in Verbindung mit einer totalen Färbung zu verwenden wie SYPRO Ruby oder Coomassie. Dadurch sollte es möglich sein, zwischen einem stark phosphorylierten und gering abundanten oder einem gering phosphorylierten und stark abundanten Protein zu unterscheiden. Das Protokoll wurde zunächst nach Angaben des Herstellers durchgeführt und im weiteren Verlauf modifiziert. Die Modifikation bestand darin, dass nach der Fixierung mehrere Waschschriffe mit viel Wasser erfolgten, um das TCA und Methanol, das für die Fixierung verwendet wurde, vollständig zu entfernen. Des Weiteren wurde die angegebene Färbezeit um eine halbe Stunde verlängert.

2.9.10 Probenvorbereitung für die *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS)

2.9.10.1 Spotpicking

Die zu analysierenden Proteinspots oder Proteinbanden wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze oder einem Skalpell so eng wie möglich aus dem Polyacrylamidgel

ausgeschnitten, um das Verhältnis von Protein zu Gelmatrix möglichst groß zu halten. Bei den SYPRO Ruby und anschließend kolloidal Coomassie gefärbten Gelen galten abundante Spots, die kolloidal gefärbt werden konnten als Anhaltspunkte für das *Spotpicking*. Zusätzlich wurde ein 1:1 Ausdruck der SYPRO Ruby Gele unter die kolloidal Coomassie gefärbten Gele gelegt.

2.9.10.2 Entfärbung

Coomassie kolloidal gefärbte Gele wurden während der Probenaufbereitung entfärbt. Eine spezielle Entfärbung war im Gegensatz zu silbergefärbten Gelen nicht notwendig. Silbergefärbte Gele wurden nach dem Protokoll von Gharahdaghi et al. (1999) entfärbt.

2.9.10.3 Reduktion und Alkylierung

Bei Proteinen, die durch 2D-PAGE aufgetrennt wurden, war eine Reduktion und Alkylierung nicht notwendig, da diese Schritte schon während der Equilibrierung durchgeführt worden waren. Eine Reduktion und Alkylierung erfolgte bei Proteinen, die über 2D-HPLC sowie SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden mit 50 µl 10 mM DTT in 0,1 M (NH₄)HCO₃, pH 7,83 für 45 Minuten bei 56°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Gelstück mit 50 µl 55 mM IAA in 0,1 M (NH₄)HCO₃, pH 7,83 versetzt. Die Proben wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

2.9.10.4 Tryptischer Verdau der Proteine

Nach der Reduktion und Alkylierung wurden die Gelstücke für den tryptischen Verdau vorbereitet. Hierfür wurden die Gelstücke in 1 x 100 µl ACN/ 0,025 M NH₄HCO₃ für 10 Minuten geschüttelt und anschließend in 100 µl ACN für wenige Minuten geschrumpft. Der Überstand wurde abgesaugt und die Gelstücke für 20 Minuten in einer Speed-Vac getrocknet. 100 µg bovines Trypsin (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden in 80 µl 1 mM HCl aufgenommen, in 10 µl aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Trypsinverdünnung der Aliquots wurde unmittelbar vor der Zugabe zu den Gelstücken durchgeführt. Ein 10 µl Aliquot wurde mit 390 µl 5 mM NH₄HCO₃, pH 8,0 versetzt. Die Gelstücke wurden in 10 µl Trypsinverdünnung rehydratisiert. Nachdem die Gelstücke aufgequollen waren, wurden 10 µl 5 mM NH₄HCO₃ hinzugefügt. Die Proben wurden bei 37°C über Nacht verdaut. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße kurz abzentrifugiert und der Verdau durch Zugabe von TFA gestoppt. Die finale Endkonzentration der TFA betrug 0,2% (v/v).

2.9.10.5 Probenvorbereitung für MALDI-TOF

Nach dem Verdau wurden die Proben für die MALDI-Messungen vorbereitet. Die Proben wurden mit einem gleichen Volumen 0,3% (v/v) TFA/ACN versetzt und für 10 Minuten im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super AK156H, SCHALLTEC GmbH Mörfelden-Walldorf, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Zu jedem Gelstück wurden 20 µl ACN gegeben, der Überstand nach 5 Minuten abgenommen und mit dem vorherigen Überstand vereinigt. Die Proben wurden bei einer anschließenden Trocknung in einer Speed-Vac aufkonzentriert. Zwischenzeitlich wurden C18-Tips (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) equilibriert, welche die Probe entsalzten. Für die Equilibrierung wurden C18-Tips 3 x mit 10 µl 0,1% (v/v) TFA und anschließend 3 x mit 10 µl 0,1% (v/v) TFA gewaschen. Dabei war darauf zu achten, die Pipettierschritte sehr langsam durchzuführen, um das Säulenmaterial nicht austrocknen zu lassen. Die Lagerung der C18-Tips erfolgte in 0,1% (v/v) TFA. Nach der Trocknung wurden zu jedem Gelstück 8 µl 0,1% (v/v) TFA/5% (v/v) ACN gegeben. Die Proben wurden für 10 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe 10 x mit einem equilibrierten C18-Tip aufgesaugt und 3 x in 0,1% (v/v) TFA gewaschen. Die Elution der Probe erfolgte mit 0,5 bis 1 µl Matrix-Lösung (8 mg/ml ACHC in ACN/0,3% (v/v) TFA) auf eine Probenplatte (Applied Biosystems, Framingham, USA).

2.9.10.6 MALDI-TOF MS Messungen

Die MALDI-TOF MS Messungen wurden zu Beginn der Arbeit mit einem MALDI-TOF Voyager DE STR Massenspektrometer (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) bei der PLANTON GmbH (Kiel, Deutschland) durchgeführt. Die Messungen beschränkten sich auf die Proteine aus der Kernfraktion. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die MALDI-TOF Analysen mit einem 4700 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) von Dr. Christoph Gelhaus (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Leippe, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) durchgeführt. Gemessen wurde im positiven Reflectron Modus bei einer angelegten Spannung von 20 kV. Jedes Spektrum akkumulierte sich aus 1000 Laserschüssen.

2.10 Computerprogramme, Datenbankrecherchen und Sequenzanalysen

Gele wurden mit dem Epson Perfection 1670 Lichtbildscanner oder mit einem Fluoreszenzscanner (Fujifilm FLA-5000, Düsseldorf, Deutschland) eingescannt. Die Bildanalysesoftware Advanced Image Data Analyzer Software V3.10.039 (AIDA, Raytest, Straubenhardt, Deutschland) ermöglichte die Analyse von digitalen Bildern und die

Unterscheidung der Intensität. Die anschließende Auswertung der 2D-Gele wurde mit dem Programm PDQuest 7.2.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Zur Systemsteuerung der PF2D HPLC Anlage sowie für die Analyse der 1. Dimension und für die Integration der Peaks in der 2. Dimension wurde die 32 Karat 7.0 Software (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) benutzt. Die Software DeltaVue (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) wurden anschließend für die Analysen der über 2D-HPLC erhaltenen Chromatogramme verwendet. Alignments von DNA- und Proteinsequenzen erfolgten mit dem Accelrys GCG Softwarepaket (San Diego, CA, USA) oder BioEdit 7.0.5 (Ibis Therapeutics, Carlsbad, Kanada). Phylogenetische Ananlysen wurden mit dem GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA USA) erstellt. Für mikroskopische Aufnahmen wurde die Software Olympus Cell^F (Olympus Hamburg, Deutschland) verwendet. Die experimentellen Daten wurden statistisch mit dem Programm Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA) ausgewertet. Das Programm Voyager Data Explorer Version 3.5.0.0 wurde für die Kalibrierung der MALDI-TOF Spektren verwendet, die mit dem MALDI-TOF Voyager DE STR MS gemessen wurden (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA).

Für Datenbankrecherchen zu Sequenzinformationen sowie zu Mutanten wurden die Server folgender Institutionen genutzt: The National Center of Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sowie dessen Blast Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>), The Institute for Genomic Research (TIGR, <http://www.tigr.org/>), The Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.info/>), Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL, <http://signal.salk.edu/>), Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>).

Peak-Listen mit erhaltenen Peptidmassen wurden in das Programm MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/>) oder in die Suchmaschine MASCOT Peptide Mass Fingerprinting (<http://www.matrixscience.com/>) eingegeben. Über die NCBI Datenbank wurden die Proteine schließlich identifiziert. Die Suche wurde auf *Arabidopsis thaliana* (L.) oder *Oryza sativa* (L.) beschränkt. Ein Proteinscore von >64 wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Tiefwasserreis (*Oryza sativa* L.) und *Arabidopsis thaliana* (L.) innerhalb von ein bis zwei Stunden auf hypoxische Bedingungen reagieren. Reis und Arabidopsis unterscheiden sich in Bezug auf ihre Hypoxietoleranz (1.1). (i) In Reis wurden über einen subtraktiven Proteomansatz Proteine identifiziert, die als Antwort auf Überflutung reguliert waren. (ii) In Arabidopsis wurden während eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Dr. Rudy Dolferus (CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien) Transkriptionsfaktoren untersucht, die über ein *Microarray Screening* als reguliert identifiziert worden waren (Klok et al., 2002). Im Fokus des zweiten Teils dieser Arbeit stand der Transkriptionsfaktor AtRAP2.2. Die Arbeiten zur Charakterisierung des Transkriptionsfaktors AtRAP2.2 wurden anschließend in Kiel weitergeführt. Beide Teile der Arbeit hatten zum Ziel, zu verstehen, wie in Pflanzen ein hypoxisches Signal zu einer Anpassung führt. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt: Proteomanalysen, die in Reis durchgeführt wurden und Genexpressionsanalysen des Transkriptionsfaktors *AtRAP2.2* als möglicher Signalüberträger für Hypoxie in Arabidopsis.

3.1 Proteomanalysen an Reis (*Oryza sativa* L.)

Proteomanalysen erfassen immer nur einen unvollständigen Teil des Gesamtproteoms. Um ein möglichst umfassendes Bild des Proteoms zu erhalten, wurden zwei komplementäre Methoden angewandt. In einem ersten Ansatz wurden lösliche Gesamt- oder Kernproteine von nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. In einem zweiten Ansatz wurden lösliche Gesamtproteine von nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen chromatographisch über zwei Dimensionen und anschließend in der dritten Dimension über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Ergebnisse zeigten, dass Unterschiede im Proteinmuster nach Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen von gefluteten oder nicht gefluteten Pflanzen mit der Methode der 2D-Gelelektrophorese nicht detektiert werden konnten. Eine Vorfractionierung des Kernproteoms erwies sich im Vergleich zur Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen als geeignet, um Unterschiede im Proteinmuster nach Überflutung mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese zu detektieren. Unterschiede im löslichen Gesamtextrakt wurden schließlich mit der Methode der 2D-HPLC detektiert und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie identifiziert.

3.1.1 Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen über 2D-Gelelektrophorese ergab keine Unterschiede in den Proteinmustern von Kontrollpflanzen und Pflanzen nach Überflutung

Um eine hohe Proteinauflösung und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, wurde zunächst eine Proteinextraktionsmethode für Proteine aus Reisstängeln entwickelt (2.9.1). Als Pflanzenmaterial dienten das interkalare Meristem und ein Teil der Elongationszone. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode wurden lösliche Gesamtproteine von Kontrollpflanzen sowie aus gefluteten Pflanzen über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Versuche wurden Zeitpunkte zwischen 30 Minuten und 2 Stunden Überflutung gewählt, um Proteine zu identifizieren, die schon sehr früh als Antwort auf Überflutung induziert werden. Für alle Zeitpunkte wurden drei biologische Kontrollen durchgeführt, die für eine statistische Analyse notwendig waren. Um möglichst viele Proteine aufzutrennen, wurde in der ersten Dimension zunächst ein pH Bereich von 3-10 nicht-linear (NL) gewählt. Nach der zweidimensionalen Auftrennung wurde eine kolloidale Coomassie-Färbung durchgeführt (Abbildung 7). Die Gele wurden mit der Auswertungssoftware PDQuest (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) über ein *Mastergel* statistisch miteinander verglichen. Ein durchgeführter *t*-Test ergab mit einem Signifikanzniveau von 95%, dass keine Unterschiede im Proteinmuster vorhanden waren.

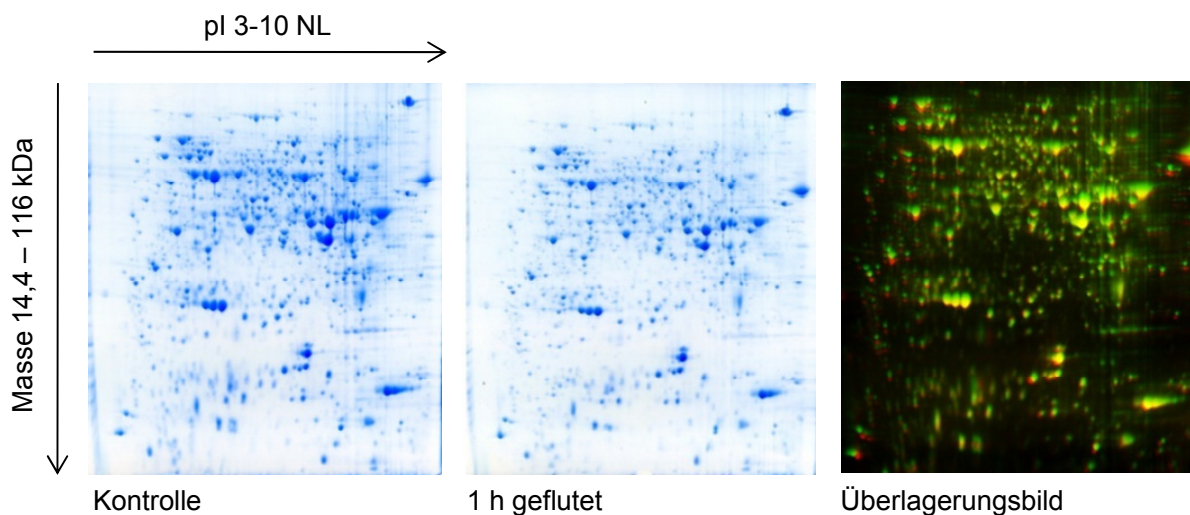


Abbildung 7: Vergleich von zwei kolloidal Coomassie gefärbten 2D-Gelen mit aufgetrennten löslichen Gesamtproteinen von nicht gefluteten (Kontrolle) oder 1 Stunde gefluteten Pflanzen. Dargestellt sind beispielhaft zwei von sechs Gelen. In der ersten Dimension wurde ein pH Gradient von 3-10 NL verwendet. Alle Gele wurden mit 750 µg Protein beladen. Rechts in der Abbildung ist ein *Overlay*-Bild gezeigt, in dem zwei Gele übereinander gelegt wurden (grüne Farbe = Kontrolle, rote Farbe = 1 Stunde geflutet). Überlagerte Spots erscheinen gelb.

Kolloidal Coomassie gefärbte Gele zeigten ein hochreproduzierbares Proteinmuster ohne erkennbare Unterschiede zwischen Kontrolle und Überflutung. Möglicherweise war diese Färbung nicht sensitiv genug, um gering abundante differentiell regulierte Proteine zu erkennen. Um diese Proteine erfassen zu können, wurden die Gele einer sensitiveren Färbemethode, einer Silberfärbung, unterzogen und anschließend mit der Software PDQuest (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) auf Unterschiede analysiert (Abbildung 8). Es wurden keine Unterschiede in den Gelen detektiert.

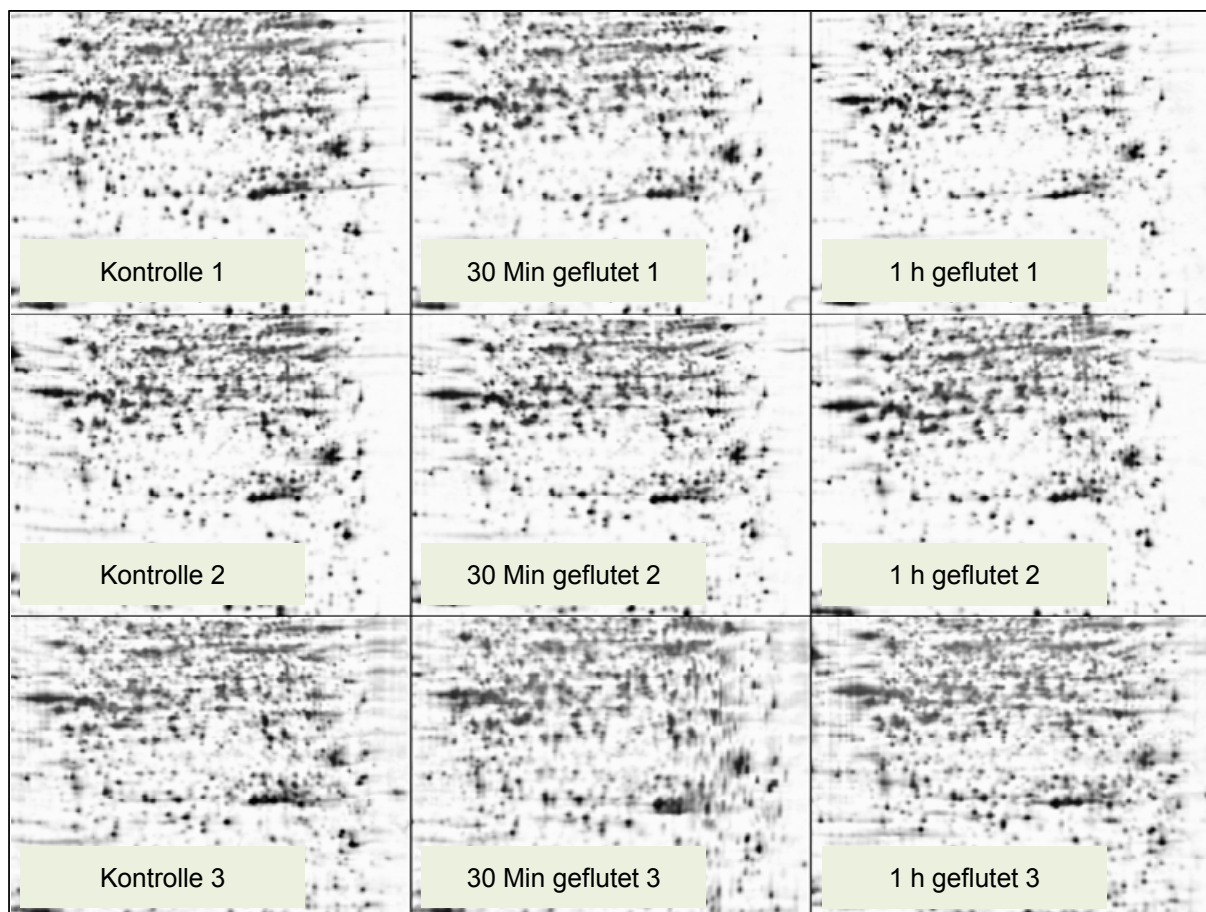


Abbildung 8: Vergleich der Proteinmuster von nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen. Dargestellt sind Ausschnitte von silbergefärbten 2D-Gelelektrophorese-Bildern mit Proteinen von nicht gefluteten Pflanzen (Kontrolle) und von Pflanzen, die für 30 Minuten oder eine Stunde geflutet waren. Die Gele wurden mit 50 µg Protein beladen. Die Ausschnitte wurden mit der PDQuest Auswertungssoftware erstellt.

Des Weiteren wurden Proteine in der ersten Dimension in einem engeren pH-Bereich aufgetrennt, um dadurch eine bessere Auflösung zu erhalten (Abbildung 9). Nach einer Silberfärbung wurden in den hochreproduzierbaren Gelen keine signifikanten Unterschiede nach Überflutung festgestellt. Eine Einengung des pH Bereiches in der ersten Dimension ergab eine bessere Auflösung. Es waren ebenfalls keine differentiell regulierten Proteine detektierbar.

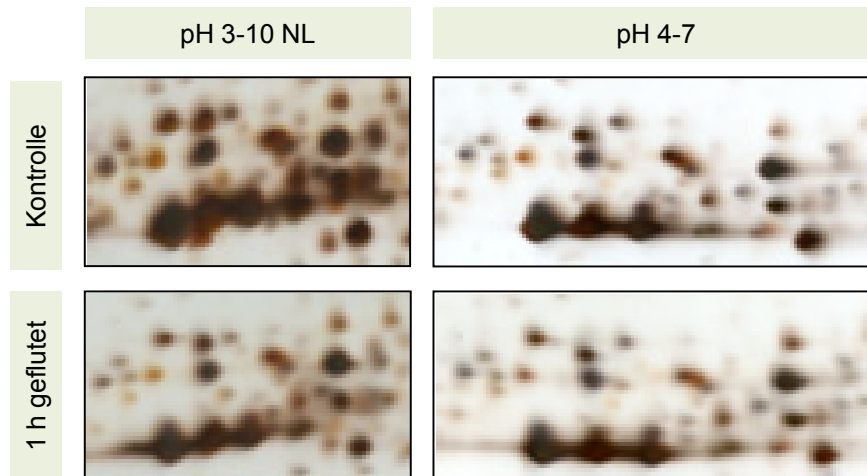


Abbildung 9: Ausschnitt von silbergefärbten 2D-Gelelektrophoresen nach Proteinauftrennung bei verschiedenen pH Gradienten. Verglichen wurden 2D-Gele nach Auftrennung im pH Bereich 3-10 NL oder pH 4-7 von löslichem Gesamtprotein von nicht gefluteten (Kontrolle) oder für 1 Stunde gefluteten Pflanzen.

Ein direkter Vergleich von Proteinmustern nach kolloidaler Coomassie-Färbung mit einer Silberfärbung zeigte, dass alle Proteinspots aus den silbergefärbten Gelen auch in kolloidal Coomassie gefärbten Gelen wiederzufinden waren. Zusätzlich lieferten Gele aus unterschiedlichen Versuchsansätzen ein reproduzierbares Proteinmuster (Abbildung 10).

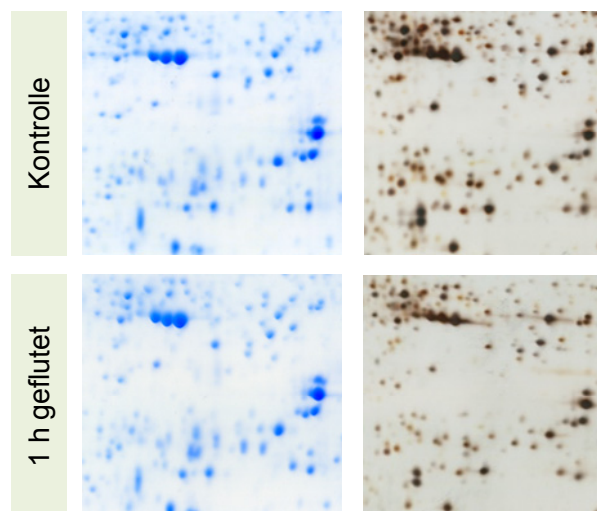


Abbildung 10: Vergleich von Proteinmustern nach kolloidaler Coomassie-Färbung mit Silberfärbung. Lösliches Gesamtprotein wurde aus nicht gefluteten (Kontrolle) oder gefluteten Pflanzen isoliert und in einem pH 3-10 NL aufgetrennt.

In einem Workshop wurde des Weiteren auch das *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* (DIGE) System (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) getestet, durch das

zusätzlich bestätigt werden konnte, dass im löslichen Gesamtextrakt keine unterschiedlich regulierten Proteine nach Überflutung zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Analyse von phosphorylierten Proteinen aus dem löslichen Gesamtextrakt

Phosphorylierungen sind die am häufigsten vorkommenden Modifikationen von Proteinen. Durch Phosphorylierungen wird die Aktivität zahlreicher Enzyme, Membrankanäle und anderer Zielproteine reguliert. In dieser Arbeit sollten Proteine identifiziert werden, die als Antwort auf Überflutung phosphoryliert oder dephosphoryliert werden und möglicherweise eine Rolle in der Signaltransduktion spielen könnten. Um phosphorylierte Proteine zu identifizieren, wurde der Farbstoff Pro-Q® Diamond *Phosphoprotein Gel Stain* eingesetzt, der ausschließlich phosphorylierte Proteine anfärben sollte. In Verbindung mit einer anschließenden Proteinfärbung wie SYPRO Ruby oder Coomassie sollte es möglich sein, zwischen einem gering phosphorylierten, stark abundanten Protein und einem stark phosphorylierten, gering abundanten Protein zu unterscheiden. In einem Vorversuch wurde löslicher Gesamtproteinextrakt zweidimensional aufgetrennt, zunächst mit Pro-Q® Diamond *Phosphoprotein Gel Stain*, anschließend mit SYPRO Ruby und schließlich mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Der *Phosphoprotein Gel Stain* schien bei diesem Test spezifisch phosphorylierte Proteine anzufärben (Abbildung 11).

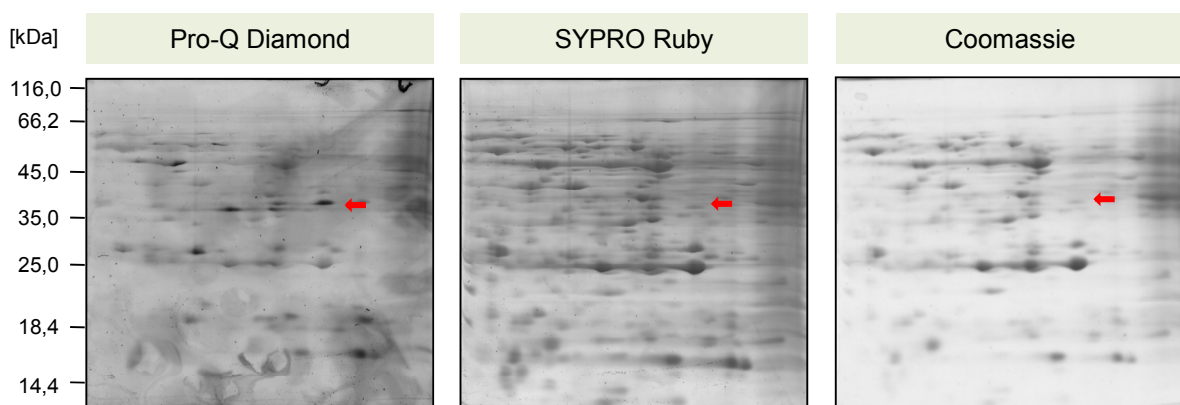


Abbildung 11: Lösliche Gesamtproteine über zwei Dimensionen aufgetrennt und nacheinander mit Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain, SYPRO Ruby und kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte in einem pH-Bereich von 5-5,5. Der rote Pfeil zeigt beispielhaft ein putativ stark phosphoryliertes, gering abundantes Protein.

In Abbildung 11 zeigt der rote Pfeil ein Beispiel für ein vermutlich stark phosphoryliertes, gering abundantes Protein. In folgenden Versuchen, in denen 2D-Gele mit aufgetrennten löslichen Gesamtproteinen aus nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen einem

Phosphoprotein Gel Stain unterzogen wurden, konnten allerdings keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Die Pro-Q[®] Diamond Färbung erwies sich als unzuverlässig und schwer reproduzierbar, so dass mit dieser Färbung keine weiteren Versuche erfolgten. Dementsprechend wurden keine Proteine, die nach Überflutung phosphoryliert oder dephosphoryliert vorlagen, identifiziert.

3.1.3 Hypoxisch regulierte Proteine sind im Kernproteom detektierbar

Im löslichen Gesamtextrakt wurden keine Unterschiede in den Proteomen von nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen detektiert. Um gering abundante Proteine anzureichern sowie die Komplexität des Proteoms zu reduzieren, wurde eine Subfraktionierung vorgenommen. Um regulatorische Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die in der Vermittlung der Hypoxieantwort eine Rolle spielen könnten, wurde das Kernproteom untersucht. Nach der Fraktionierung waren differentiell regulierte Proteine in den Kernproteomen detektierbar (Abbildung 12).

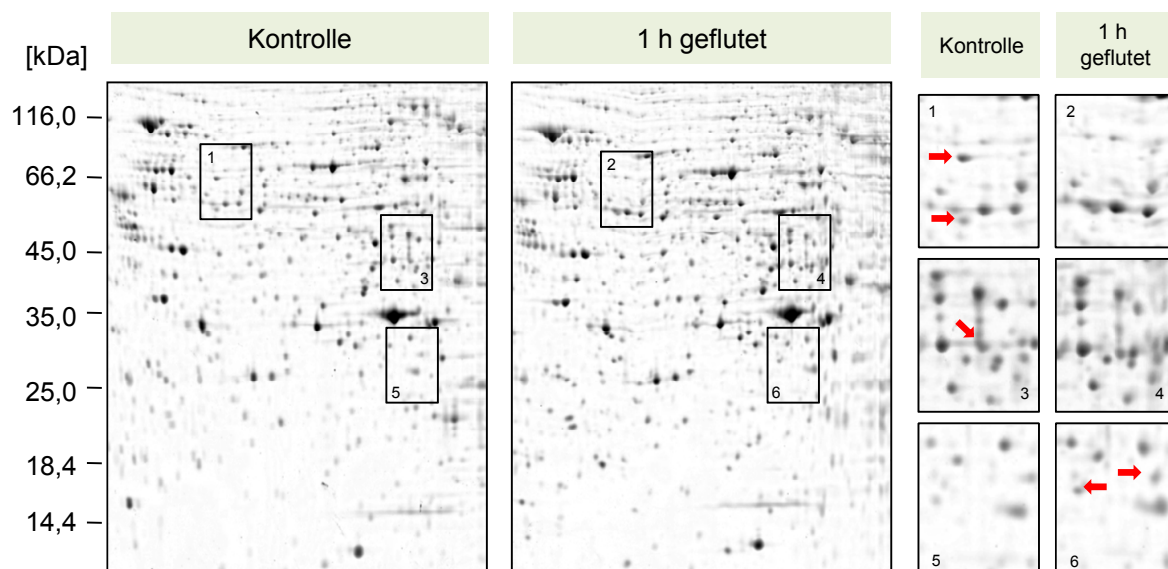


Abbildung 12: SYPRO Ruby gefärbte Kernproteine, die über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Ausschnitte von 2D-Gelen, auf denen je 200 µg Kernprotein von Kontrollpflanzen oder 1 Stunde gefluteten Pflanzen aufgetrennt und mit SYPRO Ruby gefärbt wurden. Für die erste Dimension wurde ein 3-10 NL pH Gradient verwendet. Beispiele für Unterschiede im Proteinmuster sind rechts vergrößert dargestellt und durch Pfeile gekennzeichnet. Die Proteinspots wurden aus den Gelen ausgestochen und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Nur ein Protein, das in Ausschnitt 3 mit einem roten Pfeil markiert ist, wurde als Zinkfingerprotein identifiziert.

Wie in 2.9.9.3 beschrieben, wurde nach der SYPRO Ruby Färbung eine kolloidale Coomassie-Färbung durchgeführt, um differentiell regulierte Proteine sichtbar zu machen,

aus den Gelen ausstechen und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysieren zu können. Nur eins von 14 analysierten Proteinen wurde identifiziert. Es handelt sich um ein Zinkfingerprotein (Loc_Os09g27320) mit einer ermittelten Masse von circa 40 kDa und einem ermittelten pI-Wert von circa 9 (Abbildung 12). Die theoretische Masse liegt bei 32,9 kDa und der theoretisch berechnete pI-Wert bei 9,58. In der Literatur ist dieses Protein nicht beschrieben.

3.1.4 Identifizierung von löslichen Gesamtproteinen über 2D-HPLC und SDS-PAGE

Ergänzend zur Auftrennung von Proteinen über 2D-Gelelektrophorese wurde lösliches Gesamtprotein auch über 2D-HPLC aufgetrennt. Wie unter 2.9.6 beschrieben, wurden je 2,5 mg lösliches Gesamtprotein von nicht gefluteten Pflanzen sowie von gefluteten Pflanzen über zwei Dimensionen in jeweils 576 Fraktionen chromatographisch aufgetrennt. Eine Analyse erfolgte mit der Auswertungssoftware DeltaVue (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) anhand von sogenannten Peaks, die die Regulation von Proteinen widerspiegeln. Fraktionen, in denen ein Peak, beziehungsweise dessen enthaltene Proteine, mindestens zweifach reguliert waren, wurden anschließend in der dritten Dimension über SDS-PAGE aufgetrennt. In Abbildung 13 sind beispielhaft Chromatogramme von drei verschiedenen Fraktionen, sowie deren Auftrennung in der dritten Dimension über SDS-PAGE gezeigt. Eine Auswertung der Chromatogramme mit der DeltaVue Software ergab, dass Peak 1 der ersten Fraktion 3,1-fach, Peak 2 der zweiten Fraktion 2,8-fach und Peak 3 der dritten Fraktion 2,6-fach reguliert waren. Nach der Auftrennung der Fraktionen über SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung war zu erkennen, dass eine Fraktion auch mehrere Proteine enthalten konnte (Abbildung 13). Eine Fraktion beinhaltete im Durchschnitt mindestens zehn Proteine, wodurch sich mit dieser Methode ein gesamtes Auflösungsvermögen von circa 6000 Proteinen ergab. Mit kolloidalem Coomassie konnten aufgrund der geringen Abundanz der Proteine keine Proteinbanden gefärbt werden, weshalb eine Silberfärbung durchgeführt wurde. Unterschiedlich regulierte Proteine wurden aus dem Gel eluiert, tryptisch gespalten und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Die mit Hilfe der Spektren ermittelten Proteinmassen wurden mit den theoretischen in der NCBI Datenbank verglichen. Proteine wurden nur mit einer geringen Signifikanz identifiziert, wodurch keine eindeutige Aussage über die tatsächliche Identität der Proteine getroffen werden konnte. Trotz beschriebener massenspektrometrisch kompatibler Silberfärbungen (Blum et al., 1987; Shevchenko et al., 1996) ist eine Identifizierung von silbergefärbten Proteinen oftmals problematisch (Richert et al., 2004; Jin et al., 2006; Chevallet et al., 2006). In den genannten massenspektrometrisch kompatiblen Silberfärbungen wird Formaldehyd

zum Entwickeln des Gels verwendet, das allerdings auch Proteine vernetzt, wodurch die Peptidausbeute reduziert ist.

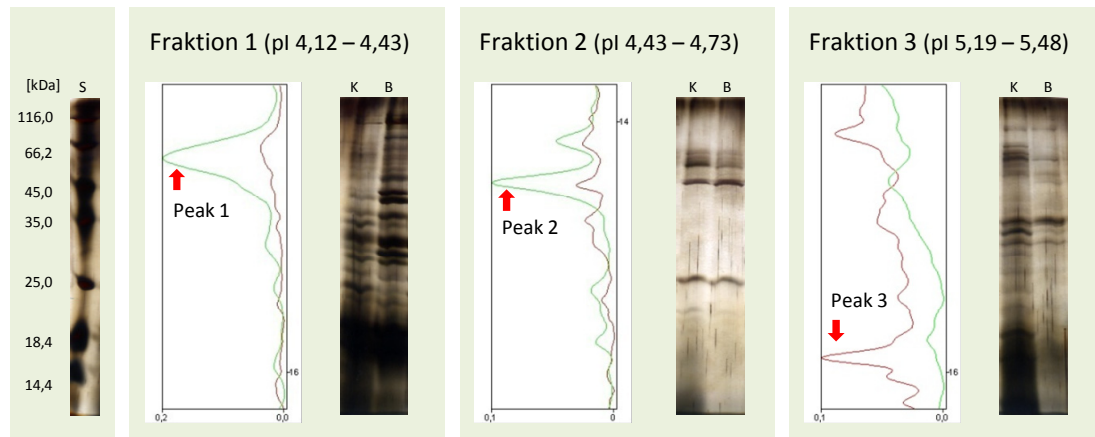
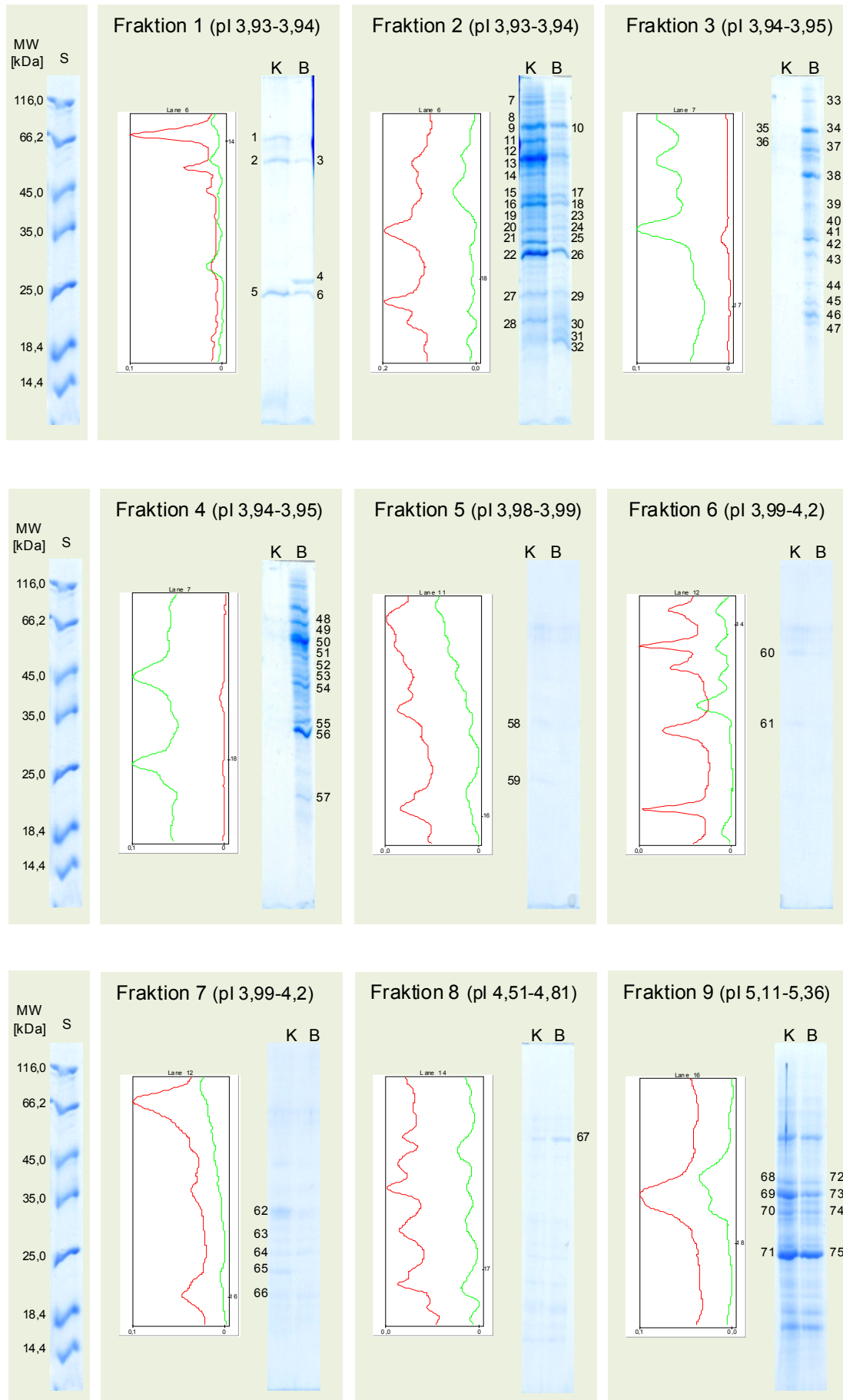
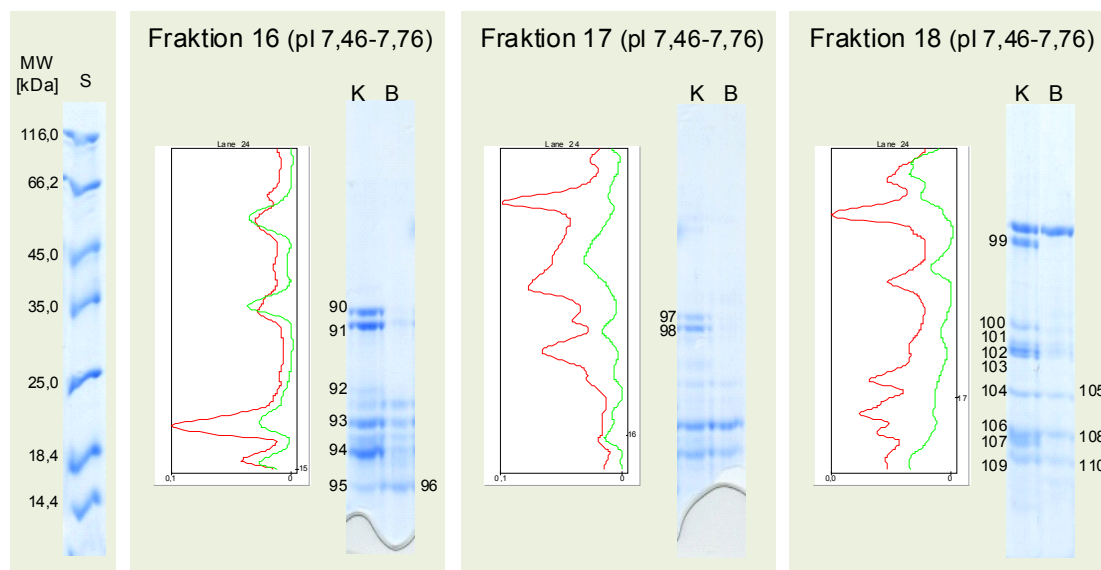
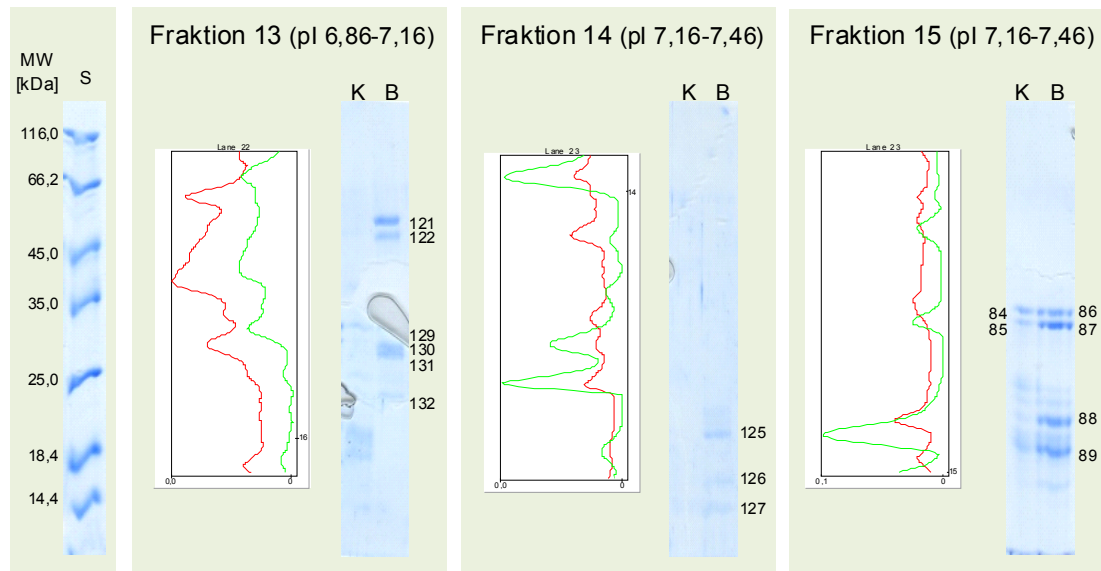
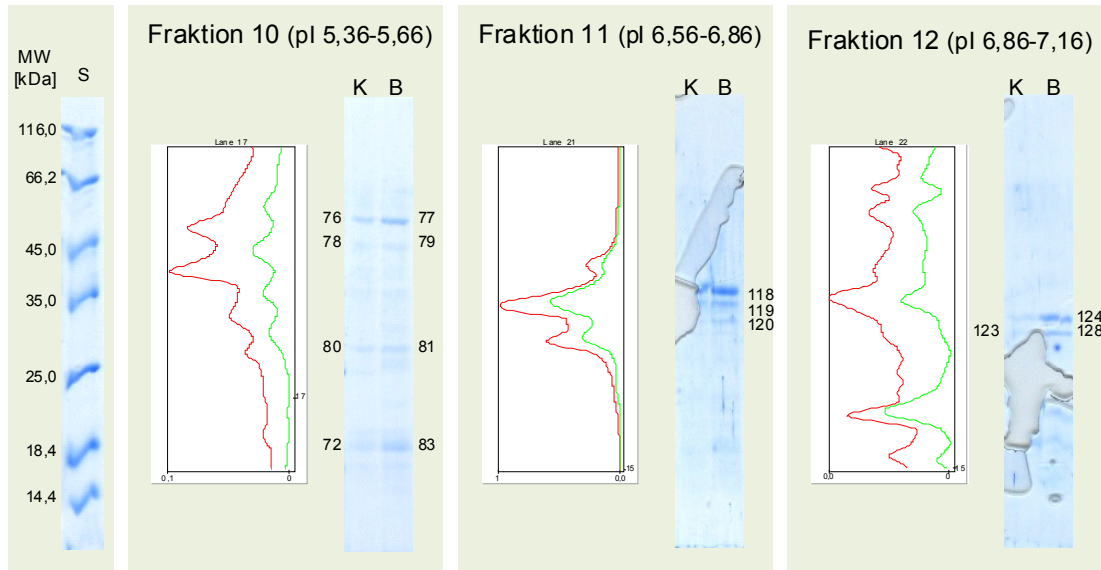


Abbildung 13: Chromatogramme von drei ausgewählten Fraktionen sowie deren Auftrennung in der dritten Dimension über SDS-PAGE. Dargestellt sind beispielhaft Fraktionen von löslichen Gesamtproteinen aus Reis, in denen sich ein oder mehrere Proteine unterschieden haben. Gele wurden silbergefärbt. Chromatogramme in roter Farbe kennzeichnen Proben von nicht gefluteten Pflanzen (K = Kontrolle) und in grüner Farbe Proben von gefluteten Pflanzen (B = Behandlung). Links in der Abbildung sind die molekularen Massen des Größenstandards in kDa angegeben. S = Standard.

Um signifikante MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie Daten zu erhalten, wurde, wie in 2.9.6 beschrieben, die Proteinmenge neunfach angereichert. Die Anreicherung sollte eine kolloidale Coomassie-Färbung ermöglichen. Eine zweidimensionale Auftrennung führte pro Kontrolle und Behandlung zu jeweils 9 mal 576 Fraktionen, die auf unterschiedlich regulierte Proteine anhand der von der Auswertungssoftware dargestellten Peakhöhen analysiert wurden. Insgesamt wurden in den 576 Fraktionen 779 Peaks detektiert. 50 dieser Peaks wurden für die weiteren Analysen ausgewählt, weil sie nach Überflutung mindestens um den Faktor 2 verändert waren. Diese 50 Peaks konnten 42 Fraktionen zugeordnet werden. Alle 42 Fraktionen wurden in der dritten Dimension über SDS-PAGE aufgetrennt. Von diesen 42 Fraktionen zeigten nur 20 Fraktionen differentiell regulierte Proteine (Abbildung 14). Grund dafür war zum einen, dass in manchen Fraktionen aufgrund der geringen Proteinmenge keine Proteine mit kolloidalem Coomassie gefärbt werden konnten, und zum anderen, dass keine Unterschiede im Bandenmuster nach der Färbung zu erkennen waren. Aus diesen 20 Fraktionen wurden 132 Banden ausgeschnitten, tryptisch gespalten und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 14, Tabelle 3).





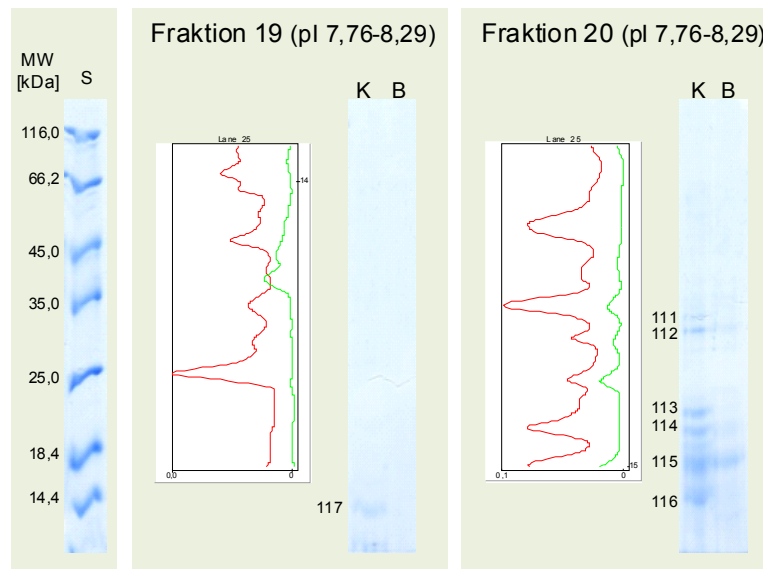


Abbildung 14: Chromatogramme von 20 ausgewählten Fraktionen sowie deren Auftrennung in der dritten Dimension über SDS-PAGE mit anschließender kolloidaler Coomassie-Färbung. Dargestellt sind Fraktionen von löslichen Gesamtproteinen aus Reis, in denen sich ein oder mehrere Proteine unterschieden haben. Chromatogramme in roter Farbe kennzeichnen die Kontrollen (= K) und in grüner Farbe die gefluteten Pflanzen, welche als Behandlungen (= B) bezeichnet wurden. Jeweils links in der Abbildung sind die molekularen Massen des Größenstandards in kDa angegeben. Mit Nummern versehene Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten, tryptisch gespalten und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert (Tabelle 3).

Insgesamt wurden 132 Proteine aus den Gelen eluiert und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Proteinbanden wurden, wenn möglich, sowohl aus Kontrollen als auch aus Behandlungen eluiert. 70 differentiell exprimierte Proteine wurden mit einer hohen Signifikanz identifiziert. Als signifikant identifiziert galten Proteine mit einem Score von > 64 . Der Proteinscore ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der es sich um das entsprechende Protein handelt. Die Datenbanksuche beschränkte sich auf die Reisdatenbank. In Tabelle 3 sind alle signifikant identifizierten Proteine aufgeführt. Des Weiteren wurden sechs weitere Proteine mit einem Score von 50-64, bei denen die theoretische Masse mit der geschätzten Masse aus den SDS-Gelen übereinstimmte, ebenfalls in Tabelle 3 aufgeführt. Einige doppelt isolierte Proteine wurden nicht mit einem Score von >64 identifiziert, jedoch ergab eine Datenbanksuche in beiden Fällen die gleiche Identität. Solche Proteine wurden deshalb als eindeutig identifiziert betrachtet und ebenfalls in Tabelle 3 aufgeführt. Insgesamt beinhaltet Tabelle 3 90 identifizierte Proteine. Eine vollständige Angabe der identifizierten Proteine mit den zugehörigen Zugangsnummern, Massen und pI-Werten sowie deren Score ist im Anhang (8) aufgeführt.

Tabelle 3: Hypoxieregulierte Proteine aus Reis. Lösliche Gesamtproteine von nicht gefluteten (K = Kontrolle) und gefluteten Pflanzen (B = Behandlung) wurden in drei Dimensionen über 2D-HPLC sowie anschließender SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 14) und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Die Nummerierung der Proteine in der linken Spalte entsprechen den Nummerierungen in Abbildung 14. Nach Überflutung hoch- oder herunterregulierte Proteine sind markiert (↑ = hochreguliert, ↓ = herunterreguliert). Nicht mit einem Pfeil markierte Proteine wurden aus der Kontrolle identifiziert. Mit einem * markierte Proteine kamen innerhalb einer Fraktion mehrfach vor oder waren in verschiedenen Fraktionen unterschiedlich reguliert. Diese Proteine wurden in die statistische Auswertung (Abbildung 15) nicht miteinbezogen. Die rechte Spalte zeigt eine putative Klassifizierung der Proteine nach der beschriebenen Funktion.

Nr.	Regulation durch Hypoxie	Protein	putative Klassifizierung
1	↓	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass	Sonstige
2		Pro-resilin precursor, putative, expressed	Unbekannt
3	↓	Pro-resilin precursor, putative, expressed	Unbekannt
4	↑	Cyclin-dependent protein kinase, putative, expressed	Zellteilung
5		PWWP domain containing protein, expressed	Unbekannt
6	↓	PWWP domain containing protein, expressed	Unbekannt
8	↓	Cell division control protein 48 homolog E, putative, expressed	Zellteilung
9		Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed	Stressantwort
10	↓	Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed	Stressantwort
11	↓*	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative, expressed	Glykolyse
13	↓*	Enolase 2	Glykolyse
14	↓*	S-adenosylmethionine synthetase 1, putative, expressed	Metabolismus, Sonstige
15		40S ribosomal protein SA, putative, expressed	Proteinbiosynthese
16		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3, putative, expressed	Glykolyse
17	↓	40S ribosomal protein SA, putative, expressed	Proteinbiosynthese
18	↓*	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3, putative, expressed	Glykolyse
19		Alpha-soluble NSF attachment protein, putative, expressed	Vesikeltransport, Sonstige
20		Proteasome subunit alpha type 1, putative, expressed	Proteinabbau
21		OsAPx2 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
22		OsAPx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
23	↓	Alpha-soluble NSF attachment protein, putative, expressed	Vesikeltransport, Sonstige
24	↓	Proteasome subunit alpha type 1, putative, expressed	Proteinabbau
25	↓	OsAPx2 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
26	↓*	OsAPx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
27		60S ribosomal protein L9, putative, expressed	Proteinbiosynthese
28	↓*	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2, putative, expressed	Proteinbiosynthese
29	↓	60S ribosomal protein L9, putative, expressed	Proteinbiosynthese
30	↑	Calmodulin, putative, expressed	Signalübertragung, Sonstige
31	↑*	Calmodulin, putative, expressed	Signalübertragung, Sonstige
32	↑*	Calmodulin, putative, expressed	Signalübertragung, Sonstige
33	↑	Villin-3, putative, expressed	Sonstige
34	↑	Heat shock protein ST1, putative, expressed	Stressantwort
37	↑	Catalase isozyme B, putative, expressed	Stressantwort
38	↑*	S-adenosylmethionine synthetase 1, putative, expressed	Metabolismus, Sonstige
39	↑	Ricin B-related lectin domain containing protein	Sonstige
40	↑	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor, putative, expressed	Photosynthese
41	↑	OsAPx6 - Stromal Ascorbate Peroxidase encoding gene, expressed	Stressantwort
42	↑	DREPP2 protein, putative, expressed	Sonstige
44	↑*	Transcription factor homolog BTF3-like protein	Proteinbiosynthese
45	↑	Transcription factor BTF3, putative, expressed	Proteinbiosynthese
46	↑	60S ribosomal protein L12, putative, expressed	Proteinbiosynthese
47	↑*	Eukaryotic translation initiation factor 5A, putative, expressed	Proteinbiosynthese
48	↑*	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative, expressed	Glykolyse
49	↑	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	Photosynthese
50	↑*	Enolase 2	Glykolyse
51	↑	S-adenosylmethionine synthetase 2	Metabolismus, Sonstige
53	↑	Coproporphyrinogen III oxidase, chloroplast precursor, putative, expressed	Photosynthese

Nr.	Regulation durch Hypoxie	Protein	putative Klassifizierung
54	↑*	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Glykolyse
55	↑	Proteasome subunit alpha type 7	Proteinabbau
56	↑*	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (Cytosolic ascorbate peroxidase 1)	Stressantwort
57	↑	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF-5A) (eIF-4D)	Proteinbiosynthese
60	↓*	Pro-resilin precursor, putative, expressed	Unbekannt
66	↓*	Transcription factor homolog BTF3-like protein	Proteinbiosynthese
67	↑*	EF-1 alpha	Proteinbiosynthese
69		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Glykolyse
70		40S ribosomal protein S3a (CYC07 protein)	Proteinbiosynthese
71		Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (Cytosolic ascorbate peroxidase 1)	Stressantwort
73	↓*	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Glykolyse
74	↓	40S ribosomal protein S3a (CYC07 protein)	Proteinbiosynthese
75	↓*	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (Cytosolic ascorbate peroxidase 1)	Stressantwort
76		EF-1 alpha	Proteinbiosynthese
77	↑	EF-1 alpha	Proteinbiosynthese
79	↑*	S-adenosylmethionine synthetase 2	Metabolismus, Sonstige
84		Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
85		Ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
86	↑	Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
87	↑*	Ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
88	↑*	60S ribosomal protein L23a (L25)	Proteinbiosynthese
90	↓	60S ribosomal protein L2 (Fragment)	Proteinbiosynthese
91	↓	40S ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
93	↓*	60S ribosomal protein L23a (L25)	Proteinbiosynthese
94	↓	60S ribosomal protein L34	Proteinbiosynthese
97	↓	40S ribosomal protein S4	Proteinbiosynthese
98	↓*	40S ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
99	↓	Hypothetical protein Osl_024215	Unbekannt
100	↓*	40S ribosomal protein S4	Proteinbiosynthese
102	↓	Ribosomal protein L6 (Fragment)	Proteinbiosynthese
103	↓	40S ribosomal protein S3	Proteinbiosynthese
104		Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
105	↓	Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
106	↓	40S ribosomal protein S13	Proteinbiosynthese
107	↓*	40S ribosomal protein S13	Proteinbiosynthese
109		40S ribosomal protein S18	Proteinbiosynthese
110	↓	40S ribosomal protein S18	Proteinbiosynthese
112	↓*	Ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
114	↓	Os01g0348700	Proteinbiosynthese
116	↓	Hypothetical protein Osl_029233	Unbekannt
118	↑*	Ricin B-related lectin domain containing protein	Sonstige
124	↑	40S ribosomal protein S6	Proteinbiosynthese
132	↑	40S ribosomal protein S7	Proteinbiosynthese

Identifizierte Proteine wurden nach deren Funktionen klassifiziert. In Abbildung 15 ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Klassifizierungsgruppen gezeigt. Proteine, die mehrfach vorkamen, wie zum Beispiel Calmodulin (Probe 30-32), wurden nur einmal in die Klassifizierung aufgenommen. Proteine, die in zwei oder drei Fraktionen vorkamen und unterschiedlich reguliert waren, das heißt, einmal in der Kontrolle und einmal in der Behandlung, wurden nicht in die statistische Verteilung der Klassifizierungsgruppen einbezogen. 29 von 90 identifizierten Proteinen fielen dadurch aus der Wertung. Von den 60 Proteinen waren 23 Proteine nach Überflutung herunterreguliert und 20 Proteine hochreguliert. Die verbliebenen 18 Proteine wurden aus den Kontrollen identifiziert. Klassifizierungsgruppen, die nur aus einem Protein bestanden hätten, wurden zusammengefasst und der Gruppe „Sonstige“ zugeordnet.

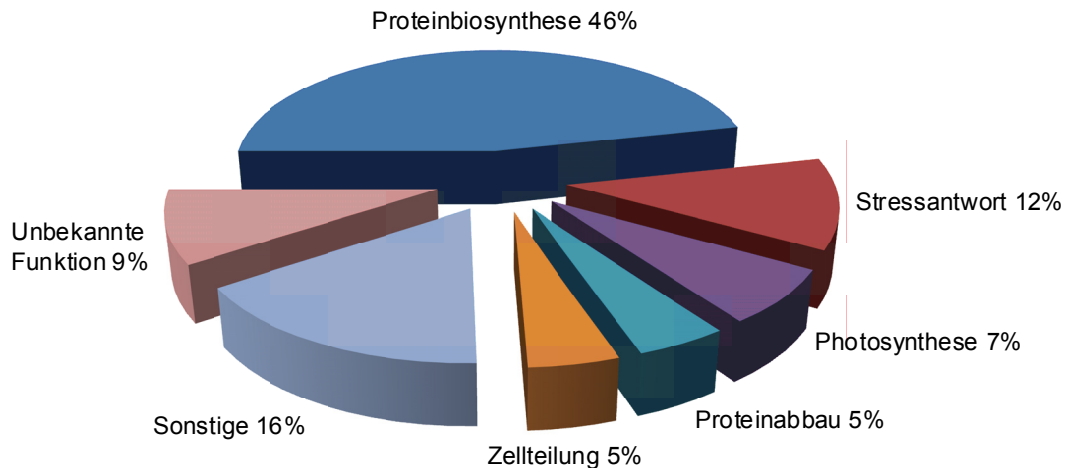


Abbildung 15: Putative Klassifizierung von identifizierten Proteinen nach deren putativen biologischen Funktionen. Unter der Gruppierung „Sonstige“ wurden Proteine mit unterschiedlichen Funktionen zusammengefasst, für die aufgrund ihrer geringen Anzahl keine gesonderte Klassifizierung vorgenommen wurde.

Die größte Gruppe (46%) bestand aus Proteinen, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Dazu gehörten vor allem unterschiedliche ribosomale Untereinheiten, EF-1 alpha und der Translationsinitiationsfaktoren BTF3. BTF3 (β -NAC) wurde ursprünglich in HeLa Zellen als genereller Transkriptionsfaktor identifiziert, der *in vitro* für die Aktivität der RNA Polymerase II benötigt wird (Zheng et al., 1990). Wiedmann et al. (1994) konnten später zeigen, dass BTF3 als β -Untereinheit des *nascent polypeptide-associated complex* (NAC) in der Steuerung der Proteinlokalisierung während der Translation involviert ist, indem eine Interaktion mit dem Signalerkennungspartikel (SRP) vermieden wird, wodurch nicht sekretorische Proteine nicht ins Endoplasmatische Retikulum (ER) gelangen.

In die Gruppierung „Sonstige“ fielen 16% aller identifizierten Proteine mit unterschiedlichen Funktionen, denen aufgrund ihrer geringen Anzahl keine gesonderte Klassifizierung zugeordnet wurde. Zu ihnen gehörte ein *Ty3-gypsy subclass* Retrotransposon, Calmodulin, ein *alpha-soluble NSF attachment* Protein, Villin-3, DREPP2, S-Adenosylmethionin Synthetase 2 sowie ein Protein mit einer *ricin B-related lectin* Domäne. *Ty3-gypsy subclass* Retrotransposons gehören zu den LTR Retroelementen. Die Expression der am besten charakterisierten pflanzlichen Retrotransposons ist nicht konstitutiv sondern entwicklungsabhängig und unter anderem auf Stressbedingungen zurückzuführen (Grandbastien, 1998). Calmodulin ist als Calciumsensor bekannt, der viele Enzyme und Transportproteine stimuliert. Das *alpha-soluble NSF attachment* Protein ist in die Vesikelfusion mit einer Zielmembran involviert (Wilson et al., 1992). Villin-3 ist ein calciumreguliertes Aktinbindeprotein (Bretscher und Weber, 1979). DREPPs wurden erstmals in Tabak als eine neue Familie von Plasmamembranpolypeptiden beschrieben, die

während der Entwicklung unterschiedlich reguliert sind. Diese Polypeptide wurden DREPPs (*developmentally regulated plasma membrane polypeptides*) genannt (Logan et al., 1997). Talamè et al. (2007) zeigten durch ein *Microarray Screening*, dass *DREPP2* Transkriptmengen bei Trockenstress in Gerste hochreguliert waren. In Arabidopsis wurden von in einem Proteomansatz brassinosteroidregulierte Proteine der Plasmamembran analysiert (Tang et al., 2008). Eines dieser brassinosteroidregulierten Proteine war AtDREPP (At4g20260). Eine Überexpression von *AtDREPP* resultierte in einer teilweisen Unterdrückung des Phänotyps einer Brassinosteroid defizienten Mutante *det2*, die durch Zwergenwuchs charakterisiert ist, woraus geschlossen wurde, dass AtDREPP eine wichtige Rolle in dem durch Brassinosteroid begünstigten Pflanzenwachstum spielt. Die S-Adenosylmethionin Synthetase 2 synthetisiert S-Adenosylmethionin (AdoMet) aus Methionin und ATP (Peleman et al., 1989). Ricin, ein dimerisches, toxisches Lektin aus Samen des Wunderbaumes (*Ricinus communis*) ist das bestcharakterisierte Mitglied einer Klasse von pflanzlichen Polypeptiden, die auch als *ribosome-inactivating proteins* bekannt sind. Es besteht aus zwei Untereinheiten, einer zuckerbindenden Untereinheit (B), die an Rezeptoren von Zellmembranen bindet und einer Untereinheit (A) mit einer enzymatischen Aktivität, die Ribosomen angreift und inaktiviert (Rutenberger et al., 1987). Sequenzanalysen ergaben, dass Ricin-B Lektindomänen in der Natur weit verbreitet sind. Durch die Bindung an Kohlenhydratstrukturen von Glykokonjugaten vermitteln sie wichtige Adhäsion- und Kommunikationsprozesse (Hazes, 1996; Chandra et al., 2006).

Der Anteil der Proteine, die in der Stressantwort involviert sind, betrug 12% aller identifizierten Proteine. Zu dieser Klassifizierungsgruppe wurden zwei Hitzeschockproteine, Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und Hitzeschockprotein STI (*stress induced*) gezählt. Detoxifizierende Enzyme wie die cytosolischen Ascorbatperoxidasen 2, Katalase Isozym B und die stromale Ascorbatperoxidase 6, die in den Zellen enzymatisch Wasserstoffperoxid spalten, wurden ebenfalls zur Gruppe der Stressantwortproteine zugeordnet.

Zu den Proteinen mit unbekannter Funktion, die einen Anteil von 9% von allen identifizierten Proteinen einnahmen, gehörten ein *pro-resilin* Vorläuferprotein, ein Protein mit einer PWWP-Domäne und vier hypothetische Proteine, die aufgrund dieser Arbeit als reelle Proteine bezeichnet werden können. Resilin gehört zu den elastomerischen Proteinen. Anders als im tierischen System ist in Pflanzen eine genaue Funktion von Resilin als elastomerisches Protein bisher nicht bekannt. In Pflanzen gibt es ein gut beschriebenes elastomerisches Protein, das Gluten. Die elastomerischen Eigenschaften von Gluten spielen keine bekannte biologische Rolle (Tatham et al., 2001). Proteine mit einer PWWP-Domäne enthalten das konservierte Motiv Pro-Trp-Trp-Pro. Sie kommen in mehr als 60 eukarotischen Proteinen vor und spielen eine Rolle bei Zellteilung, Wachstum und Differenzierung. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass sie im Kern lokalisiert zu sein scheinen, oft DNA-

bindende Proteine sind und als Transkriptionsfaktoren Entwicklungsprozesse regulieren (Stec et al., 2000). Ge et al. (2004) zeigten, dass die PWWP-Domäne eine vermittelnde Funktion bei der Chromatinbindung einnimmt und essentiell für die Funktion von DNA-Methyltransferasen in Säugetieren ist. Unter den PWWP Proteinen ist die größte homologe Gruppe verwandt mit den HDGF (*hepatoma-derived growth factor*) (Nameki et al., 2008). Eine genaue Funktion von pflanzlichen Proteinen mit einer PWWP-Domäne wurde bisher nicht gefunden. Bisher wurde lediglich ein *ATM* Ortholog mit einer PWWP-Domäne in *Arabidopsis* untersucht, dessen präzise Rolle nicht vorhergesagt werden konnte. *ATM* ist ein Gen, welches bei der humanen Krankheit *Ataxia Telangiectasia* mutiert ist (Garcia et al., 2000). Mit den beiden als hypothetisch bezeichneten Proteinen wurde eine BLAST Suche durchgeführt. Bei dieser BLAST Suche mit den Sequenzen der als hypothetisch bezeichneten Proteine mit der Nummerierung 99 und 116 stellte sich heraus, dass es sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit um ribosomale Proteine handelte.

Photosynthetische Proteine wiesen einen Anteil von 7% auf. Zu dieser Gruppe gehörten ein *oxygen-evolving enhancer* Protein 1, welches im Photosystem II involviert ist, eine große Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase und die Coproporphyrinogen III Oxidase, ein Enzym, das in der Biosynthese von Chlorophyll und Häm einen wichtigen Schritt katalysiert.

Die Gruppe „Proteinabbau“ und „Zellteilung“ hatten einen Anteil von jeweils 5%. Zwei proteasomale Untereinheiten wurden der Gruppe Proteinabbau zugeordnet. Die Klassifizierungsgruppe „Zellteilung“ beinhaltet eine cyclinabhängige Proteinkinase und ein Zellteilungsprotein (*cell division control protein 48 homolog E*).

Um herauszufinden, ob Proteine innerhalb einer Klassifizierungsgruppe nach Überflutung ähnlich reguliert waren, wurde ermittelt, wieviel Prozent der Proteine hoch- oder herunterreguliert waren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Prozentuale Verteilung der Klassifizierungsgruppen, die nach Überflutung hoch- oder herunterreguliert waren.

putative Klassifizierung	herunterreguliert [%]	hochreguliert [%]
Proteinbiosynthese	65	35
Stressantwort	40	60
Photosynthese	0	100
Proteinabbau	50	50
Zellteilung	50	50
Sonstige	29	71
Unbekannte Funktion	100	0

Nach Überflutung herunterreguliert, waren ein Großteil der Proteine der Proteinbiosynthese (65%) und alle Proteine unbekannter Funktion (100%). Nach Überflutung hochreguliert waren photosynthetische Proteine (100%). Von der Gruppe „Sonstige“, die Proteine mit unterschiedlichen Funktionen enthielten, waren 71% der Proteine nach Überflutung hochreguliert. In den verbleibenden Klassifizierungsgruppen waren keine einheitlichen Tendenzen einer hypoxischen Regulation zu beobachten.

3.2 Die Rolle von *AtRAP2.2* bei der Anpassung von *Arabidopsis thaliana* (L.) an Hypoxie

Im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit stand die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors *AtRAP2.2*. *AtRAP2.2* wurde ursprünglich über ein *Microarray Screening* identifiziert, bei dem Gene gesucht wurden, die als Antwort auf Sauerstoffmangel bei Dunkelheit in Arabidopsiswurzelskulturen reguliert waren (Klok et al., 2002). Als genetischer Marker für Sauerstoffmangel diente das Gen der Alkoholdehydrogenase 1 aus Arabidopsis, *AtADH1*, welches durch Sauerstoffmangel, aber auch durch andere abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Trockenheit und Salinität sowie durch das Phytohormon Abscisinsäure induziert wird (Dolferus et al., 1994; De Bruxelles et al., 1996). *AtADH1* wurde bereits als stressrelevantes Modellgen verwendet, um Promotorelemente zu untersuchen, die hypoxische Gene regulieren (Dolferus et al., 1994). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (i) *AtRAP2.2* zur Familie der ERFs (*ethylene response factors*) gehört und verwandt ist mit den SUB-Proteinen aus Reis, die Überflutungstoleranz in Indica-Flachlandreis vermitteln (Fukao et al., 2006; Xu et al., 2006); (ii) *AtRAP2.2* durch Ethylen reguliert wird; (iii) Hypoxie die ethylenabhängige Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression verstärkt und (iv) Überexpression oder Repression von *AtRAP2.2* die Genexpression von *AtADH1* verändert.

3.2.1 Die Expression von *AtRAP2.2* wird innerhalb einer Stunde durch 5% Sauerstoff im Dunkeln induziert

In einem *Microarray Screening* mit Arabidopsiswurzelskulturen wurden Gene identifiziert, die als Antwort auf Sauerstoffmangel bei Dunkelheit hoch- oder herunterreguliert waren (Klok et al., 2002). Unter diesen Genen befanden sich unter anderem fünf hochregulierte Transkriptionsfaktoren. Vier dieser fünf Transkriptionsfaktoren, *AtRAP2.2* (At3g14230), *AtRAP2.3* (At3g16770), *AtRAP2.12* (At1g53910) und *AtDREB2A* (At5g05410), gehören zur Familie der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren, die unter anderem in der abiotischen Stressantwort von Pflanzen eine Rolle spielen (Büttner und Singh, 1997; Stockinger et al.,

1997; Fujimoto et al., 2000; Tomashow, 2001; Sakuma et al., 2002). Ein fünfter identifizierter Transkriptionsfaktor *AtMYB96* (*At5g62470*) gehört zur R2R3-MYB Genfamilie. Hoeren et al. (1996) zeigten, dass der *trans*-Faktor *AtMYB2* (*At2g47190*) in der Lage ist, an das GT-Motiv des *AtADH1* Promotor zu binden und dadurch die *AtADH1* Genexpression zu induzieren. Weil *AtMYB96* stärker als *AtMYB2* als Antwort auf Sauerstoffmangel induziert wird, bestand die Vermutung, dass es sich bei *AtMYB96* möglicherweise um einen zu *AtMYB2* redundanten Transkriptionsfaktor handeln könnte. Während eines Forschungsaufenthaltes am CSIRO (Canberra, Australien) wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit zunächst die *Microarray*-Daten der fünf von Klok et al. (2002) identifizierten Transkriptionsfaktoren verifiziert. Hierfür wurden über semi-quantitative RT-PCR relative Transkriptmengen nach Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln bestimmt (Abbildung 16).

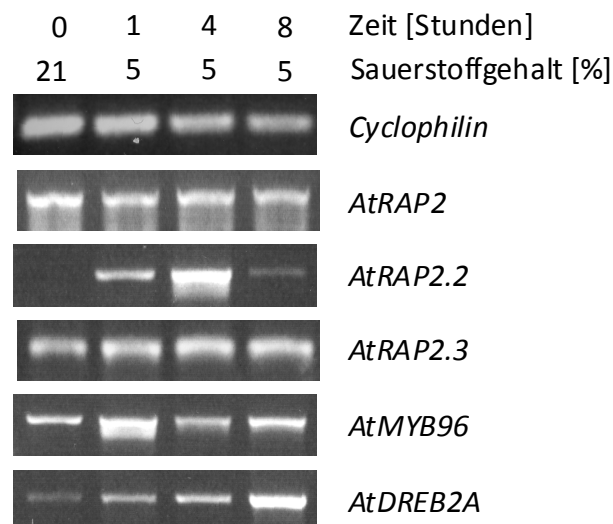


Abbildung 16: Semiquantitative RT-PCR Expressionsanalyse der fünf von Klok et al. (2002) identifizierten Transkriptionsfaktoren *AtRAP2*, *AtRAP2.2*, *AtRAP2.3*, *AtMYB96* und *AtDREB2A*. 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden für 0 Stunden, 1 Stunde, 4 Stunden oder 8 Stunden mit 5% Sauerstoff im Dunkeln behandelt. *Cyclophilin* wurde als Kontrollgen eingesetzt.

Für den Versuch wurden 2,5 Wochen alte Pflanzen verwendet und nicht Wurzelkulturen wie in den ursprünglichen *Microarrays*, um die Expression in einem natürlichen System zu untersuchen. Die Kinetik der Genexpression der fünf Transkriptionsfaktoren wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden bestimmt. *Cyclophilin* wurde als Kontrollgen in der RT-PCR eingesetzt, um die cDNA Synthese sowie die Menge der eingesetzten cDNA zu überprüfen. Transkriptmengen von *AtRAP2* und *AtRAP2.3* waren durch Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln nicht verändert. *AtRAP2.2* und *AtMYB96* wurden transient induziert. *AtRAP2.2* war nach einer Stunde induziert und erreichte eine maximale Expression nach 4 Stunden. *AtMYB96* war nach einer Stunde maximal induziert.

AtDREB2A Transkriptmengen stiegen nach einer Stunde an und erreichten eine maximale Expression nach 8 Stunden. Drei der fünf Transkriptionsfaktoren, *AtRAP2.2*, *AtMYB96* und *AtDREB2A*, waren somit bereits nach einer Stunde Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln induziert (Abbildung 16).

Um zu klären, ob der Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2*, der zur Subfamilie der ERFs gehört (Sakuma et al., 2002), eine Rolle bei der frühen Anpassung an Sauerstoffmangel spielt, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Fokus auf die Charakterisierung von *AtRAP2.2* gelegt. Viele ERF-Transkriptionsfaktoren binden an Promotorbereiche, die eine GCC-Box enthalten (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Yang et al., 2005; Zhao et al., 2006). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass *AtRAP2.2* an das GC-Motiv des *AtADH1* Promotors binden und dadurch die Genregulation von *AtADH1* steuern könnte.

3.2.2 *AtRAP2.2* und *OsSUB1* gehören zur Subfamilie der ERFs

Fukao et al. (2006) und Xu et al. (2006) identifizierten einen QTL (*quantitative trait locus*), *Submergence-1 (SUB1)*, der in Indica-Flachlandreis Überflutungstoleranz vermittelt. Dieser QTL besteht aus einem variablen Cluster von drei ERF-Genen. Um die Verwandtschaft zwischen *AtRAP2.2* und *OsSUB1a*, *OsSUB1b* und *OsSUB1c* zu untersuchen, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung 17).

Basierend auf der detaillierten genomweiten Analyse von ERF/AP2-Transkriptionsfaktoren in Reis und Arabidopsis von Nakano et al. (2006), gehören die SUB1-Proteine aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Domänenstruktur zur Gruppe VII. Diese Gruppe enthält 14 Proteine in Reis während fünf Proteine in Arabidopsis vorhanden sind. Gruppe VII ist in Reis wesentlich komplexer und in verschiedene Untergruppen mit unterschiedlich konservierten Domänen unterteilt, die in der Gruppe VII der Dikotyledonen nicht existieren (Nakano et al., 2006). Die meisten Proteine der Gruppe VII in Reis, einschließlich der SUB1 Proteine, gruppierten sich separat von den Proteinen aus Arabidopsis. Nur eines der Proteine aus Reis, *OsEREBP1* (Os02g54160) gruppierte zusammen mit den Arabidopsis-Proteinen. *OsEREBP1* wurde mit der Regulation von PR-Genen (*pathogenesis-related*) in Verbindung gebracht (Cheong et al., 2003). *AtRAP2.2* ist nah verwandt mit *AtRAP2.12* und zwei weiteren ERFs, *JERF3* aus Tomate und *CaPF1* aus Pfeffer, die bei der Vermittlung von Salz- und Frosttoleranz eine Rolle spielen (Wang et al., 2004; Yi et al., 2004). Zwischen den beiden größeren Reis- und Arabidopsis-Clustern befanden sich zwei kleinere Cluster. *AtRAP2.3* wurde in ein kleines Cluster mit insgesamt drei Proteinen aus Arabidopsis gruppiert. Das zweite kleine Cluster enthielt zwei Proteine aus Monokotyledonen, *Os03g08470* aus Reis und *HvRAF* aus Gerste. Dieses Cluster wies eine enge Verwandtschaft mit dem Cluster auf, indem sich *AtRAP2.2* befand. Jung et al. (2007)

zeigten, dass *HvRAF* eine Rolle bei der Pathogenresistenz und bei der Salztoleranz spielt. Zusammengefasst lässt sich der Schluss ziehen, dass *AtRAP2.2* zu derselben Subfamilie gehört wie die SUB1 Proteine aus Reis. In Hinblick auf Phylogenie und Ähnlichkeit in der Domänenstruktur hat Arabidopsis jedoch kein wahres Äquivalent zu den SUB1 Proteinen aus Reis, die Überflutungstoleranz vermitteln.

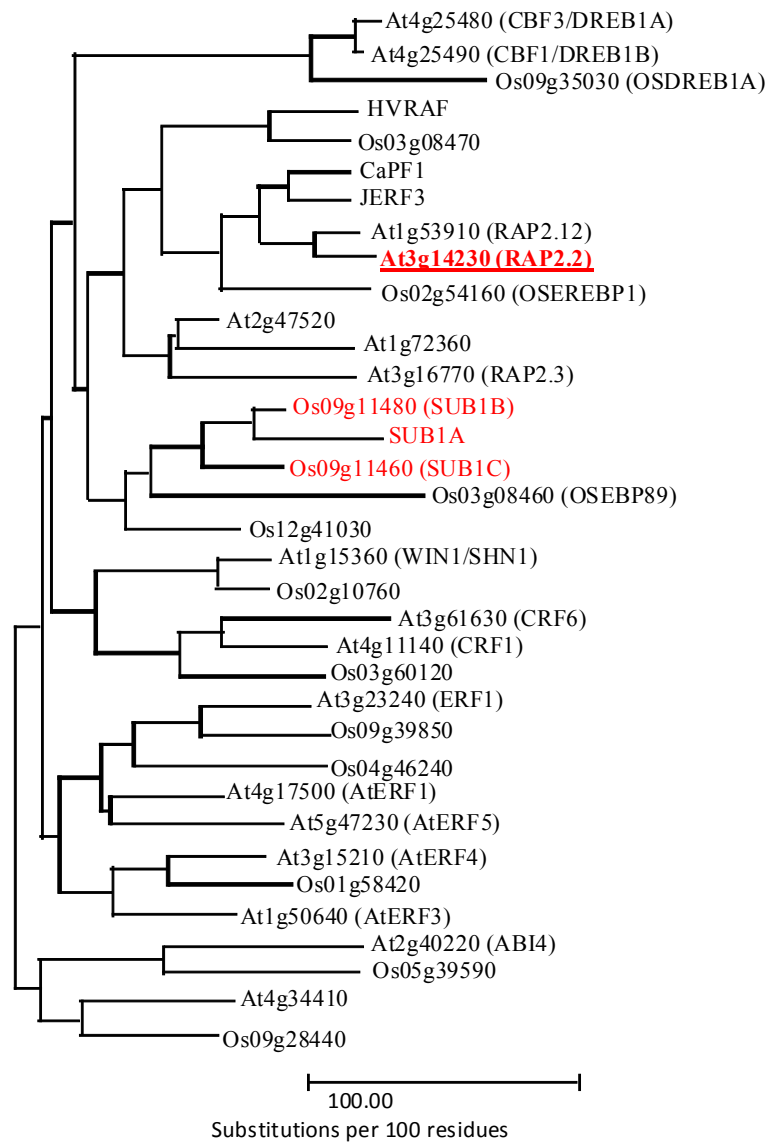


Abbildung 17: Phylogenetischer Stammbaum von ERF/AP2-Transkriptionsfaktoren nach Dolferus (unveröffentlicht). Dargestellt sind ERF-Transkriptionsfaktoren aus Reis und Arabidopsis, die zur Subgruppe VII gehören (Nakano et al., 2006), die der B-2 Gruppe (Sakuma et al., 2002) entspricht. Zusätzlich enthält der phylogenetische Stammbaum AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren anderer Pflanzenspezies, die bislang beschrieben wurden. Für die Erstellung des Stammbaumes wurden Proteinsequenzen verwendet. Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-Joining-Methode unter Verwendung der Kimura-Distanz erstellt.

3.2.3 $P_{AtRAP2.2}$:GUS Expressionsanalysen

Um die gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von *AtRAP2.2* zu untersuchen, wurden $P_{AtRAP2.2}$:GUS-Pflanzen hergestellt und auf GUS-Aktivität untersucht. Zwei Linien zeigten eine vergleichbare Färbung und wurden näher untersucht. Bilder einer Promotor-GUS-Linie sind exemplarisch dargestellt (Abbildung 18).

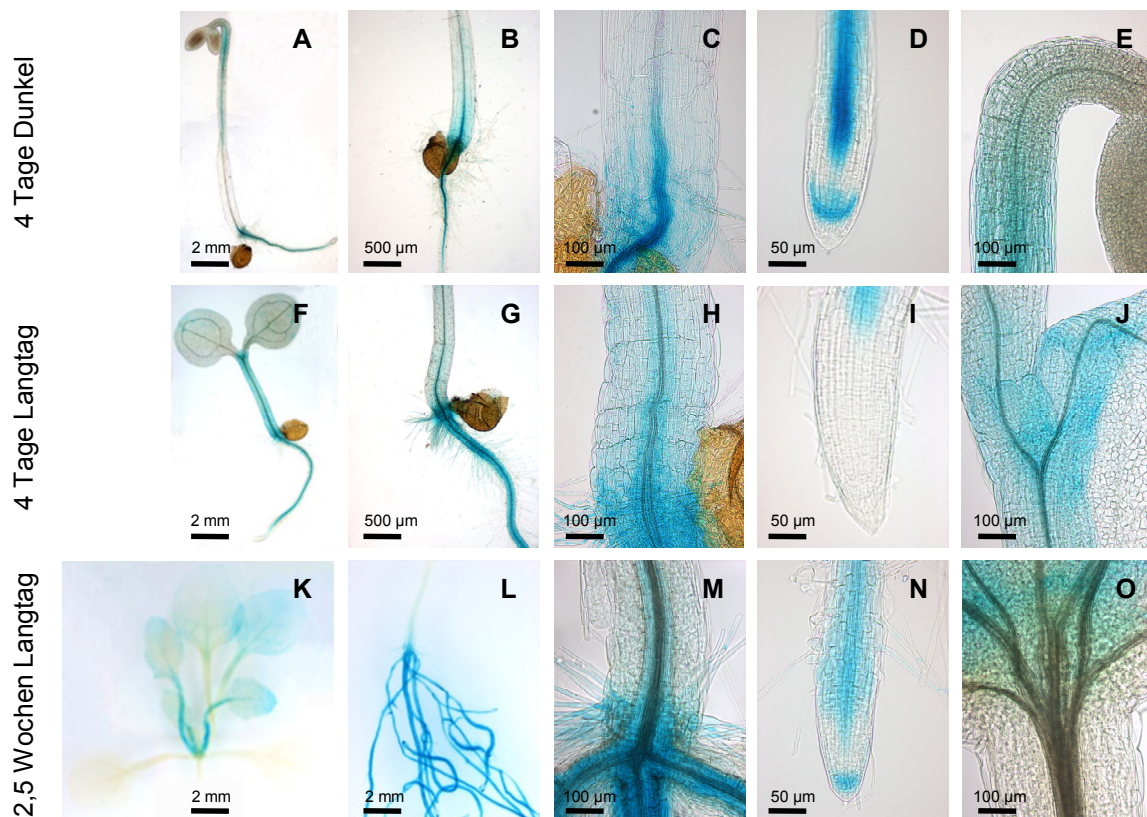


Abbildung 18: Untersuchungen der Expression von *AtRAP2.2* über P:GUS-Analysen. (A-E) 4 Tage alter etiolierter Keimling, (F-J) 4 Tage alter Keimling, der unter Langtagbedingungen angezogen wurde, (K-O) 18 Tage alte Pflanze, die unter Langtagbedingungen angezogen wurde. (A, F) ganzer Keimling, (K) Spross, (B, C, G, H, L, M) Spross/Wurzelübergang, (D, I, N) Wurzelspitze, (E, J) Hypokotyl, (O) Sprossspitze.

GUS-Aktivität wurde in 4 Tage alten Keimlingen, die entweder im Langtag oder im Dunkeln angezogen wurden, sowie in 2,5 Wochen alten Pflanzen, die im Langtag angezogen wurden, untersucht. In allen Pflanzen wurde GUS-Aktivität sowohl im Spross als auch in Wurzeln beobachtet (Abbildung 18A, F, K, L). In Wurzeln aller untersuchten Pflanzen war die Aktivität im gesamten Organ zu beobachten und wesentlich stärker ausgeprägt als im Spross. Die höchste Aktivität wurde in den Leitbündeln der Wurzeln festgestellt (Abbildung 18B, G, L). 4 Tage alte etiolierte Keimlinge und im Langtag angezogene 2,5 Wochen alte Pflanzen zeigten eine Promotor-Aktivität in der Wurzelspitze (Abbildung 18D, N). Die

Promotoraktivität könnte im Meristem, bestehend aus dem ruhenden Zentrum und den angrenzenden Initialzellen lokalisiert sein (Abbildung 18D). Die Aktivität in der Wurzelspitze war bei 4 Tage alten Keimlingen, die im Langtag angezogen wurden, nicht nachweisbar (Abbildung 18I). Im Spross von etiolierten Keimlingen war die GUS-Aktivität im oberen Teil des Hypokotyls stärker als im unteren Teil des Hypokotyls (Abbildung 18A, E). In lichtangezogenen Keimlingen hingegen war sie gleichmäßig im Hypokotyl verteilt (Abbildung 18F). Im Spross von 2,5 Wochen alten Pflanzen beschränkte sich die Promotor-Aktivität hauptsächlich auf junge, sich entwickelnde Blätter einschließlich der Blattstiele und auf den Sprossapex (Abbildung 18K).

3.2.4 *AtRAP2.2* und *AtADH1* sind in Wurzel und Spross differentiell exprimiert

Northern Blot Analysen von 2,5 Wochen alten Arabidopsispflanzen (Abbildung 19) bestätigten die Ergebnisse der Promotor-GUS Expressionsanalysen (Abbildung 18). In Wurzeln und Wurzelkulturen war die Genexpression von *AtRAP2.2* wesentlich stärker als im Spross. Außerdem war die Genexpression von *AtRAP2.2* in der Wurzel konstitutiv, das heißt, dass innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 4 Stunden keine Änderung nach Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln zu erkennen war (Abbildung 19A, B). Im Spross nahm die Genexpression von *AtRAP2.2* nach halbstündiger Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln zu und erreichte eine maximale Induktion nach zwei Stunden (Abbildung 19B).

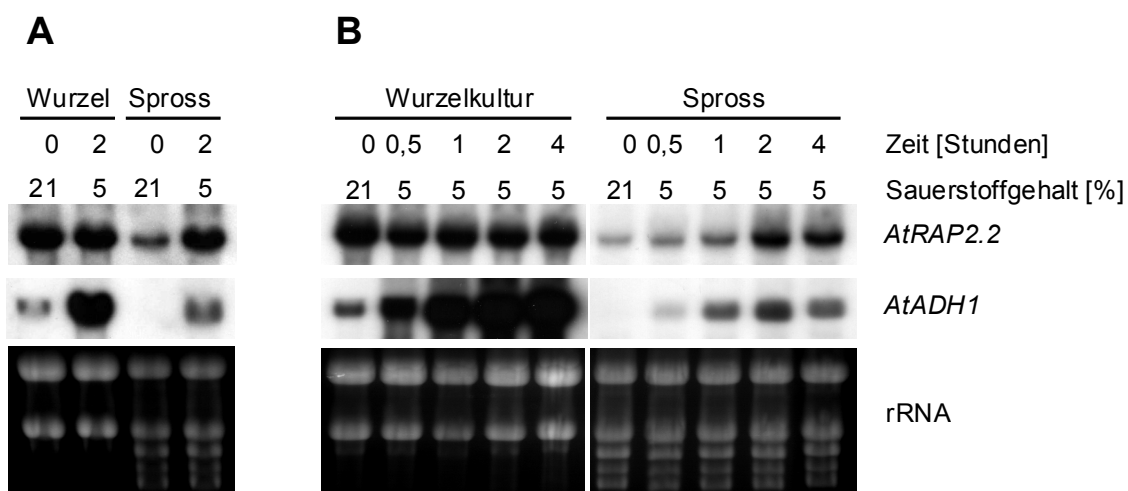


Abbildung 19: Northern Blot Analyse von *AtRAP2.2* und *AtADH1*. (A) Genexpressionsanalysen in Wurzeln und Spross von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps. (B) Expression von *AtRAP2.2* und *AtADH1* in Wurzelkulturen und im Spross von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps, die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für unterschiedliche Zeiten behandelt wurden. (A und B) rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Die Genexpression von *AtADH1* war wie die von *AtRAP2.2* in Wurzeln ebenfalls höher als im Spross. Während einer Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln nahm die Genexpression der *AtADH1* sowohl in der Wurzel als auch im Spross nach einer halben Stunde zu. Im Spross erhöhten sich die Transkriptmengen von *AtADH1* parallel zu den Transkriptmengen von *AtRAP2.2*. In Wurzeln waren, wie im Spross, Transkriptmengen von *AtADH1* nach einer halben Stunde induziert, jedoch bestand aufgrund der konstitutiven Genexpression von *AtRAP2.2* in der Wurzel keine Korrelation zwischen den Transkriptmengen von *AtRAP2.2* und *AtADH1*. In Wurzelkulturen wurde ebenfalls eine Zunahme der Transkriptmengen von *AtADH1* nach einer Behandlung mit 5% Sauerstoff beobachtet.

3.2.5 *AtRAP2.2* wird durch Ethylen reguliert

AtRAP2.2 gehört zur Subfamilie der ERFs (Sakuma et al., 2002). Um herauszufinden, ob *AtRAP2.2* durch Ethylen reguliert wird, und um der Frage nachzugehen, ob *AtADH1* möglicherweise durch *AtRAP2.2* ebenfalls ethylenreguliert ist, wurde die Expression dieser beiden Gene im Wildtyp sowie in verschiedenen Ethylensignalmutanten untersucht. Zu Beginn wurde die Genexpression von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Wildtyp sowie in den Ethylensignalmutanten *ctr1* (*constitutive triple response*) und *ein2-1* (*ethylene insensitive*) im Spross von 2,5 Wochen alten Pflanzen untersucht. Gene der ACS sind bei Licht und bei Dunkelheit unterschiedlich reguliert (Jiao et al., 1987; Voeselek et al., 1997; Thain et al., 2004; Rieu et al., 2005; Wang et al., 2005). Um zu überprüfen, ob die Induktion von *AtRAP2.2* auf Dunkelheit, auf hypoxische Bedingungen oder auf eine Kombination beider Bedingungen zurückzuführen ist, wurde die Genexpression von *AtRAP2.2* und, zum Vergleich, die Genexpression von *AtADH1* sowohl im Dunkeln als auch bei Licht unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht (Abbildung 20). Vorherige Sauerstoffmangelversuche wurden immer im Dunkeln durchgeführt, um Photosynthese der Pflanzen und einen daraus folgenden Anstieg der Sauerstoffkonzentration in den Zellen zu verhindern (Dolferus et al., 1994; Hoeren et al., 1998; Klok et al., 2002; Ismond et al., 2003).

Unter normoxischen Bedingungen war *AtRAP2.2* in der *ctr1* Mutante, die eine konstitutive Ethylenantwort zeigt, wesentlich stärker exprimiert als im Wildtyp und in der *ein2-1* Mutante, bei der die Ethylenantwort ausgeschaltet ist. Aus diesem Grund sind in Abbildung 20 auch zwei unterschiedliche Expositionszeiten der Röntgenfilme dargestellt. Eine stärkere Genexpression von *AtRAP2.2* in der *ctr1* Mutante deutet darauf hin, dass *AtRAP2.2* durch Ethylen reguliert wird. Die Expression von *AtRAP2.2* war in der *ctr1* Mutante sowohl im Licht als auch im Dunkeln erhöht. Im Wildtyp und in der *ein2-1* Mutante war unter normoxischen Bedingungen die Genexpression von *AtRAP2.2* transient nach 2 Stunden Dunkelheit erhöht

und erreichte nach 8 Stunden wieder Kontrollwerte. In der *ctr1* Mutante war keine Dunkelinduktion der *AtRAP2.2* Genexpression zu beobachten.

Hypoxische Bedingungen führten in der *ctr1* Mutante innerhalb von 2 Stunden zu einer weiteren transienten Erhöhung der Transkriptmengen. Im Wildtyp und in der *ein2-1* Mutante war dagegen keine hypoxieabhängige Geninduktion zu beobachten. Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass Sauerstoffmangel allein nicht genügt, um *AtRAP2.2* zu induzieren, sondern dass ein Ethylensignal benötigt wird. *AtRAP2.2* Transkriptmengen werden als frühe Antwort auf Ethylen innerhalb von 2 Stunden induziert.

Unter normoxischen Bedingungen war *AtADH1* in allen Genotypen nicht reguliert (Abbildung 20). Hypoxische Bedingungen hingegen führten in allen Genotypen zur Induktion der *AtADH1* Genexpression. In der *ctr1* Mutante waren *AtADH1* Transkripte im Vergleich zum Wildtyp und zur *ein2-1* Mutante durch Hypoxie verstärkt induziert, wobei die Induktion im Dunkeln stärker war als im Licht. Im Wildtyp und in der *ein2-1* Mutante war die *AtADH1* Genexpression unter hypoxischen Bedingungen ungefähr gleich stark, was darauf hindeutet, dass auch in Abwesenheit eines Ethylensignals *AtADH1* induziert werden kann. Anders als in der *ctr1*, steigerte Dunkelheit im Wildtyp und in der *ein2-1* Mutante nicht die *AtADH1* Genexpression.

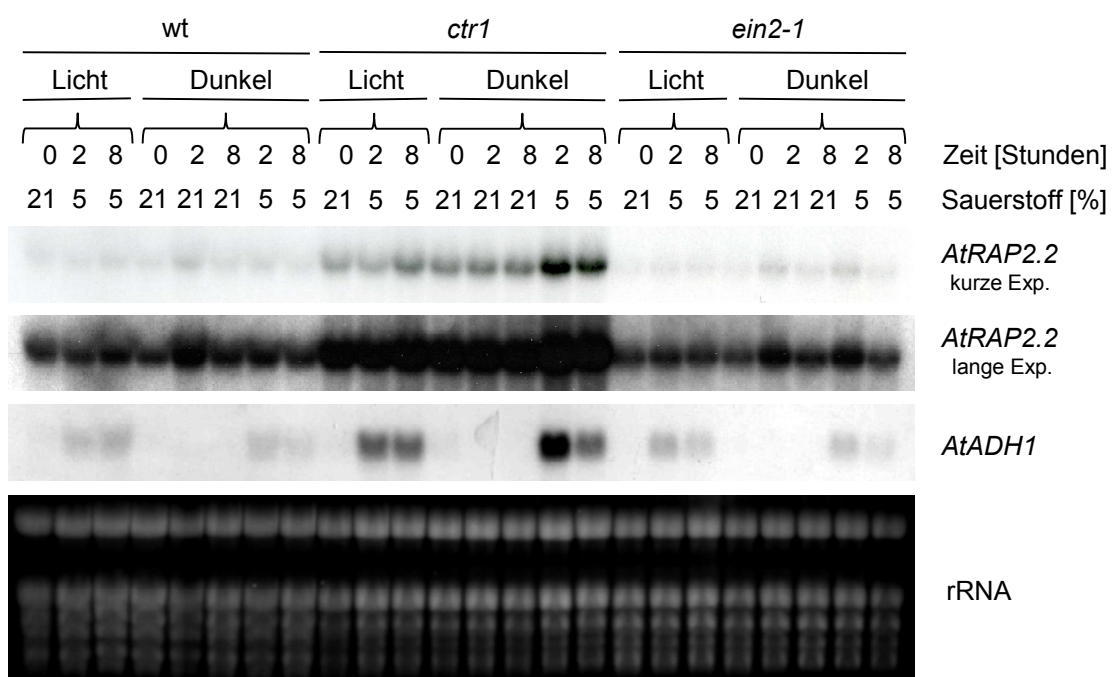


Abbildung 20: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross des Wildtyps und der Ethylensignalmutanten *ctr1* oder *ein2-1*. 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden mit 5% Sauerstoff im Dunkeln oder bei Licht für 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden inkubiert. Aufgrund der starken Expression von *AtRAP2.2* in der *ctr1* Mutante sind zwei unterschiedliche Expositionszeiten (1 Tag oder 7 Tage) der Röntgenfilme dargestellt. rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Zusammengefasst lässt sich folgern, dass ein konstitutives Ethylensignal unter hypoxischen Bedingungen die Induktion der *AtADH1* Genexpression verstärkte. Diese Induktion war bei Dunkelheit stärker. Die Genexpressionen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* in der *ctr1* Mutante waren bei hypoxischen Bedingungen im Dunkeln vergleichbar reguliert, was die Vermutung verstärkte, dass *AtRAP2.2* möglicherweise in die Genregulation der *AtADH1* involviert sein könnte.

Bisherige Untersuchungen ergaben, dass *AtRAP2.2* Transkriptmengen in Wurzel und Spross unterschiedlich reguliert waren (Abbildung 19). Während *AtRAP2.2* im Spross durch eine Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln induziert werden konnte, war es in der Wurzel nicht hypoxisch reguliert. Aufgrund der Beobachtung, dass *AtRAP2.2* im Spross durch Ethylen reguliert wird, sollte an Ethylensignalmutanten untersucht werden, ob *AtRAP2.2* auch in Wurzeln durch Ethylen reguliert wird (Abbildung 21B). Für einen direkten Vergleich von Spross und Wurzel wurde auch RNA aus dem Spross analysiert (Abbildung 21A). Im Spross wurde neben *ctr1*, *ein2* und *ein2-1* auch *ein4* untersucht. *Ein4* ist eine defekte Rezeptormutante, die durch redundante Ethylenrezeptoren partiell ersetzt werden kann, das heißt, dass die Mutation einen semidominanten Effekt hervorruft (Hua und Meyerowitz, 1998). Alle weiteren Sauerstoffmangelversuche wurden im Dunkeln durchgeführt, da *AtRAP2.2* nur im Dunkeln und nicht bei Licht induziert wurde. Im Weiteren sollte überprüft werden, ob Parallelen zwischen der Regulation von *AtRAP2.2* und der *AtADH1* Genexpression bestehen.

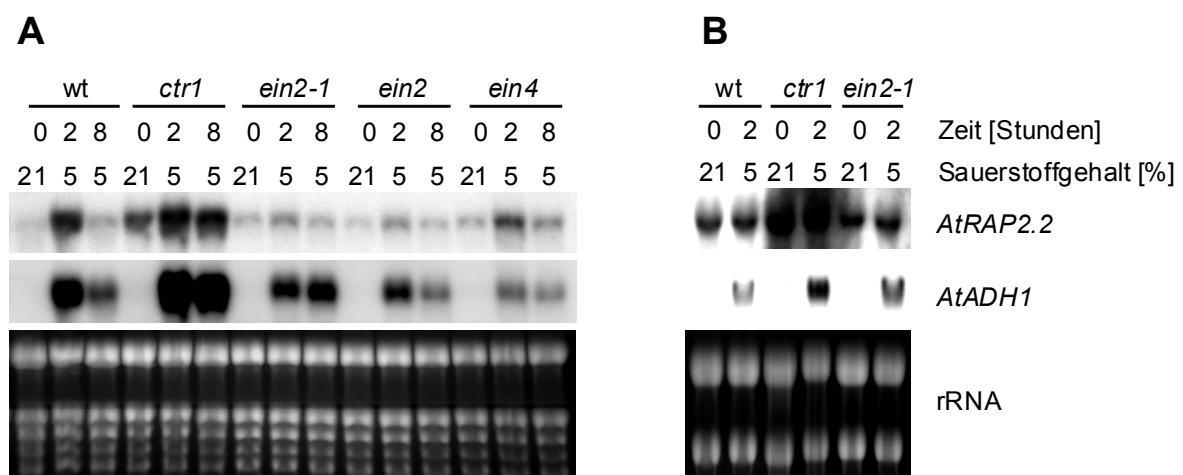


Abbildung 21: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross und in der Wurzel des Wildtyps und der Ethylensignalmutanten *ctr1*, *ein2-1*, *ein2* und *ein4*. (A) Genexpressionsanalysen im Spross von 2,5 Wochen Pflanzen und (B) in Wurzeln von 2,5 Wochen alten Pflanzen, die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für unterschiedliche Zeiten behandelt wurden. (A und B) rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Genexpressionsanalysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross von Wildtyp, *ctr1*, *ein2*, *ein2-1* und *ein4* (Abbildung 21A) bestätigten die in Abbildung 20 gezeigten Ergebnisse. Im Wildtyp war die *AtRAP2.2* Genexpression nach Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln transient nach 2 Stunden erhöht und erreichte nach 8 Stunden wieder Kontrollwerte. In den ethyleninsensitiven Mutanten *ein2-1*, *ein2* und *ein4* war die Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression durch Hypoxie im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächt. In der konstitutiven Ethylensignalmutante *ctr1* war die Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression höher als im Wildtyp. Wie zuvor (Abbildung 20) waren *AtADH1* Transkripte ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen induziert. In der *ctr1* Mutante war die Induktion höher. Repression des Ethylensignals in den Mutanten führte zu reduzierten *AtADH1* Transkriptmengen.

In Wurzeln waren *AtRAP2.2* Transkripte nach Behandlung mit 5% Sauerstoff konstitutiv stärker in der *ctr1* Mutante exprimiert als beim Wildtyp (Abbildung 21B). Im Gegensatz zum Spross bewirkte eine Behandlung mit 5% Sauerstoff keine weitere Induktion. In Wurzeln der *ein2-1* Mutante waren *AtRAP2.2* Transkripte nicht schwächer exprimiert als im Wildtyp. Wie im Spross war die Genexpression von *AtADH1* in Wurzeln der *ctr1* Mutante unter Sauerstoffmangel stärker exprimiert als im Wildtyp. In der *ein2-1* Mutante war die *AtADH1* Genexpression vergleichbar dem Wildtyp. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *AtRAP2.2* in Wurzeln in ausreichender Menge vorliegt und dadurch erhöhte *AtRAP2.2* Transkriptmengen einen geringen Effekt auf die Genexpression von *AtADH1* haben.

Zusätzlich zur Genexpressionsanalyse von *AtRAP2.2* und *AtADH1* in Ethylensignalmutanten wurde die Expression der beiden Gene als Antwort auf Ethyleneffektoren und -inhibitoren unter hypoxischen Bedingungen untersucht (Abbildung 22). Als Effektoren wurden zum einen Ethephon und ACC eingesetzt. Ethephon wird von den Pflanzen aufgenommen und bei zellulärem pH zu Ethylen umgesetzt. ACC ist die biologische Vorstufe zu Ethylen und wird durch ACC-Oxidase im Gewebe zu Ethylen umgewandelt. Zusätzlich wurden Cobaltchlorid (CoCl_2) und Silberthiosulfat (STS) eingesetzt. CoCl_2 hemmt die ACC-Oxidase während STS durch die Bindung an die Ethylenrezeptoren die Ethylenperzeption inhibiert.

AtRAP2.2 Transkripte waren nach zwei Stunden Behandlung mit 5% Sauerstoff erhöht. Zugabe von ACC und Ethephon verstärkte die Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression unter hypoxischen Bedingungen (Abbildung 22). Die Applikation des Ethyleninhibitors STS unter hypoxischen Bedingungen bewirkte eine Reduktion der *AtRAP2.2* Transkriptmengen. CoCl_2 dagegen reduzierte die Induktion von *AtRAP2.2* unter hypoxischen Bedingungen nicht. Zusammengefasst bestätigten diese Ergebnisse, dass *AtRAP2.2* durch Ethylen reguliert wird. Die Zugabe der Ethyleneffektoren wirkte sich auch auf die *AtADH1* Genexpression aus. Die durch Hypoxie hervorgerufene Induktion der *AtADH1* Genexpression wurde durch die Applikation von ACC verstärkt. Die Inhibitoren STS

und CoCl_2 reduzierten die durch Hypoxie hervorgerufene Induktion der *AtADH1* Genexpression (Abbildung 22). Bisherige Ergebnisse zeigten, dass für die hypoxische Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression ein Ethylensignal benötigt wird. Die ethylenabhängige Induktion der *AtADH1* Genexpression hingegen war abhängig von einem hypoxischen Signal. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *AtRAP2.2* in die Genregulation von *AtADH1* involviert sein könnte, wenn ein Ethylen- und ein Hypoxiesignal vorhanden sind.

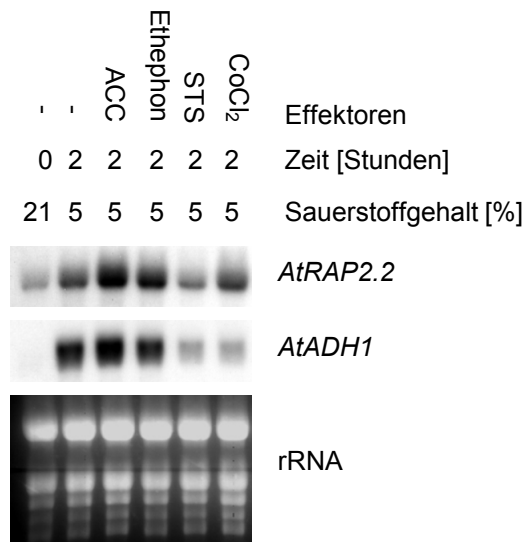


Abbildung 22: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross nach Behandlung mit Ethyleneffektoren. 2,5 Wochen alte Pflanzen des Wildtyps wurden für zwei Stunden mit 50 μM Ethephon, 50 μM 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC), 50 μM Silberthiosulfat (STS) oder 50 μM Cobaltchlorid (CoCl_2) vorinkubiert und anschließend für zwei Stunden hypoxischen Bedingungen im Dunkeln ausgesetzt. rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Um zu überprüfen, ob die ethylenabhängige Regulation von *AtRAP2.2* spezifisch ist, wurden die Expressionen von *AtRAP2.12* und *AtRAP2.3*, die zu *AtRAP2.2* nahe verwandt sind (Sakuma et al., 2002), in Wildtyp, *ctr1*, *ein2-1* und *ein3-1*, untersucht (Abbildung 23). *AtRAP2.12* Transkriptmengen waren in Wildtyp, *ctr1*, *ein2-1* und *ein3-1* vergleichbar, wohingegen *AtRAP2.3* Transkriptmengen in der *ctr1* Mutante nach 8 Stunden Behandlung anstiegen und in den ethyleninsensitiven Mutanten *ein2-1* und *ein3-1* generell reduziert waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass *AtRAP2.3*, aber nicht *AtRAP2.12* ethylenreguliert war. Allerdings wurde *AtRAP2.3* deutlich später als *AtRAP2.2* induziert. Eine ethylenabhängige frühe Induktion durch Hypoxie war somit spezifisch für *AtRAP2.2*.

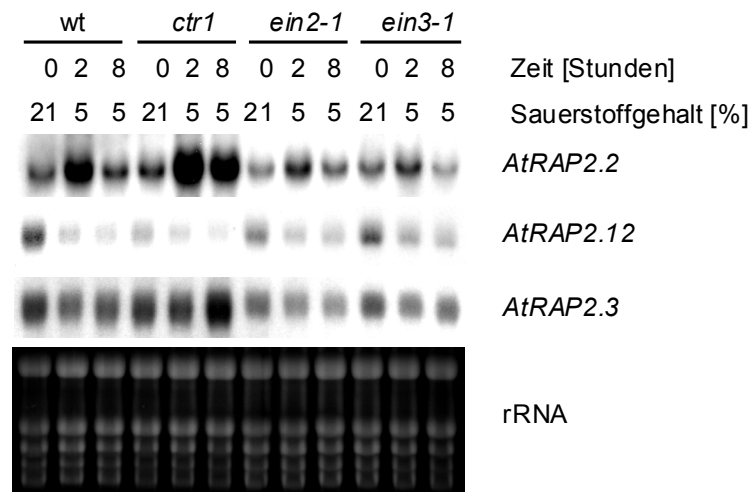


Abbildung 23: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2*, *AtRAP2.12* und *AtRAP2.3* im Spross des Wildtyps und der Ethylensignalmutanten *ctr1*, *ein2-1* und *ein3-1*. 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden behandelt. rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

3.2.6 Arabidopsispflanzen bilden unter hypoxischen Bedingungen im Dunkeln mehr Ethylen

Um zu überprüfen, ob Pflanzen nach einer Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln mehr Ethylen produzieren, wurde die Ethylenbildung nach 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden Behandlung gaschromatographisch gemessen (Abbildung 24).

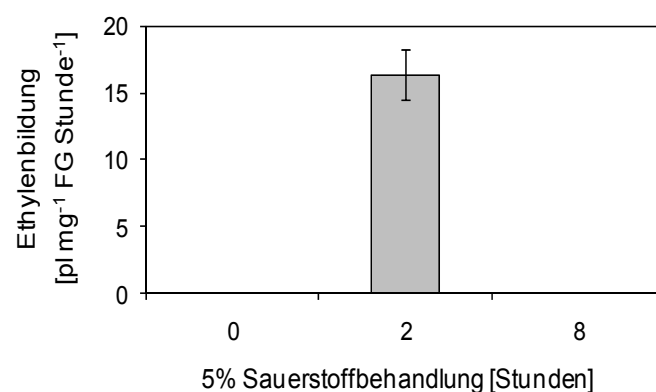


Abbildung 24: Ethylenbildung von Arabidopsis-Pflanzen nach hypoxischer Behandlung. 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden behandelt. Nach der Behandlung wurden 30 Pflanzen in ein gasdichtes Gefäß überführt und der Ethylengehalt nach einer Stunde mittels Gaschromatographie bestimmt. Die Ethylenmessungen bestanden aus drei biologischen Wiederholungen. Pro biologische Wiederholung wurden drei Messungen mit je 30 Pflanzen durchgeführt. Im Diagramm sind Mittelwerte aus neun Messungen und die entsprechende Standardabweichung angegeben.

Die Ethylenbildung innerhalb einer Stunde wurde nach der von Peng et al. (2001) beschriebenen Methode gemessen. Sie stieg innerhalb von 2 Stunden Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln an und fiel nach 8 Stunden auf nicht messbare Kontrollgehalte zurück. Diese temporäre Ethylenbildung korrelierte mit der *AtRAP2.2* Genexpression.

3.2.7 Überexpression von *AtRAP2.2* induziert *AtADH1* Genexpression und *AtADH* Aktivität

Um *AtRAP2.2* funktionell zu charakterisieren wurden *AtRAP2.2* Überexpressionslinien im Ökotyp Col-0 und zusätzlich im Ökotyp C24 generiert, da zwischen diesen Ökotypen Unterschiede in der Hypoxietoleranz bestehen. Ökotyp C24 soll in der Lage sein, hypoxische Behandlungen etwas besser zu überstehen als Col-0 (Dolferus, unveröffentlicht). Bisher gezeigte Ergebnisse wurden mit dem Ökotyp Col-0 erzielt. Bisherige Ergebnisse zeigten ähnliche Kinetiken der Induktion von *AtRAP2.2* und *AtADH1*. Um zu überprüfen, ob *AtRAP2.2* möglicherweise als Transkriptionsfaktor *AtADH1* reguliert, wurde die *AtADH1* Genexpression in den *AtRAP2.2* Überexpressionsmutanten untersucht. Drei unabhängig transformierte *AtRAP2.2* Überexpressionslinien wurden ausgewählt, um die Genexpression von *AtADH1* in Spross und Wurzel zu untersuchen (Abbildung 25A, B).

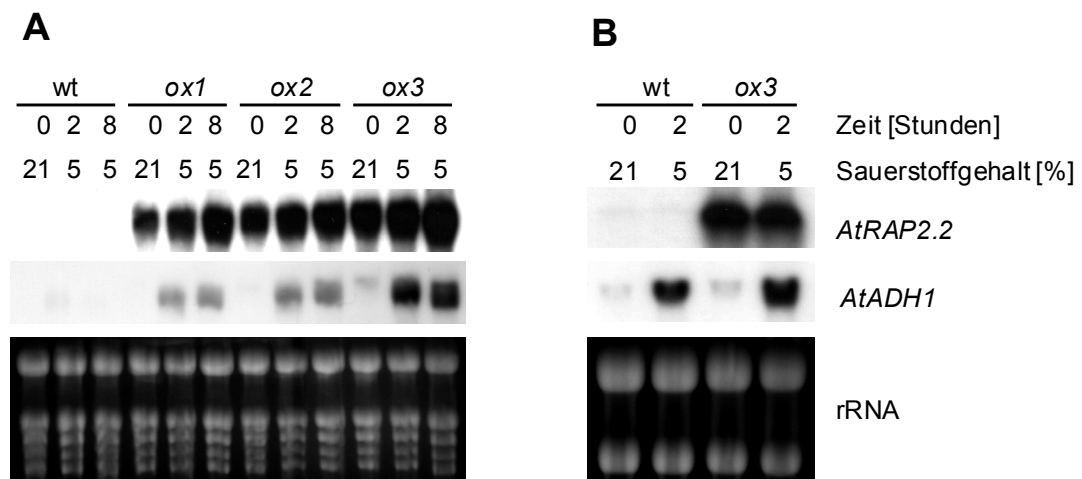


Abbildung 25: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross und in der Wurzel des Wildtyps und von drei *AtRAP2.2* Überexpressionslinien. (A) Genexpressionsanalysen im Spross von 2,5 Wochen Pflanzen des Wildtyps und der drei unabhängigen *AtRAP2.2* Überexpressionslinien, die für 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden mit 5% Sauerstoff im Dunkeln behandelt wurden. (B) Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps und der stärksten Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox3* (*ox3*), die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden oder 2 Stunden behandelt wurden. (A und B) rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Zunächst wurde überprüft, ob die drei ausgewählten Linien mit der genomischen Sequenz von *AtRAP2.2* unter Kontrolle des *CaMV35S* Promotors *AtRAP2.2* tatsächlich überexprimieren. Die Konstrukte wurden während eines Forschungsaufenthaltes in Zusammenarbeit mit Dr. Rudy Dolferus und Dr. Iain Wilson am CSIRO Plant Industry (Canberra, Australien) erstellt. Im Spross zeigten drei ausgewählte Linien des Ökotyps Col-0 eine starke Überexpression von *AtRAP2.2* unter normoxischen Bedingungen. Eine Behandlung mit 5% Sauerstoff führte zu einem weiteren Anstieg der *AtRAP2.2* Transkriptmengen (Abbildung 25A). Die stärkste Überexpression im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox3* mit einer circa 44-fachen Überexpression. *AtRAP2.2ox3* wurde aus diesem Grund für Genexpressionsanalysen in Wurzeln verwendet. In Wurzeln stiegen *AtRAP2.2* Transkriptmengen, anders als im Spross, nach einer Behandlung mit 5% Sauerstoff nicht an, wie auch schon im Wildtyp gezeigt (Abbildung 25B).

Als nächstes wurde die *AtADH1* Genexpression im Wildtyp und in den *AtRAP2.2* Überexpressionslinien untersucht (Abbildung 25). Im Spross waren unter normoxischen Bedingungen, möglicherweise abgesehen von *AtRAP2.2ox3*, keine Unterschiede in den *AtADH1* Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Unter hypoxischen Bedingungen im Dunkeln jedoch stiegen *AtADH1* Transkriptmengen mit steigender *AtRAP2.2* Überexpression an und waren in allen drei Überexpressionslinien höher als im Wildtyp. In Wurzeln waren *AtADH1* Transkriptmengen unter hypoxischen Bedingungen sowohl im Wildtyp als auch in *AtRAP2.2ox3* induziert (Abbildung 25B), allerdings war im Gegensatz zum Spross (Abbildung 25A) kein Effekt der *AtRAP2.2* Überexpression auf die Genexpression von *AtADH1* zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob gesteigerte *AtADH1* Transkriptmengen in der *AtRAP2.2* Überexpressionslinie auch zu einer gesteigerten *AtADH* Aktivität führen, wurden Enzymaktivitätsmessungen im Spross nach 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden Behandlung mit 5% Sauerstoff durchgeführt (Abbildung 26). Exemplarisch wurde die stärkste Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox3* untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp war die *ADH* Enzymaktivität in *AtRAP2.2ox3* um das bis zu 12-fache erhöht. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Wildtyp und *AtRAP2.2ox3* bestand nach 8 Stunden Behandlung mit 5% Sauerstoff (Abbildung 26). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Genregulation von *AtADH1* durch *AtRAP2.2* physiologisch relevant ist.

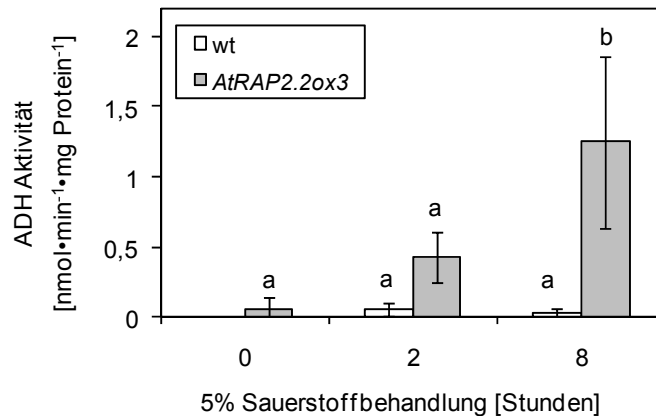


Abbildung 26: ADH Aktivität im Spross von Wildtyp und der Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox3*. Die ADH Aktivität wurde im Spross von 2,5 Wochen alten Wildtyppflanzen und *AtRAP2.2ox3* Pflanzen nach 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln gemessen. Die Mittelwerte von $n = 3$ Messungen sind mit Standardfehler angegeben. Gleiche Buchstaben kennzeichnen eine signifikante Gruppenzugehörigkeit nach einer ANOVA und einem Tukey-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,001$.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die *AtRAP2.2* Überexpression auch im Ökotyp C24 zu erhöhten *AtADH1* Transkriptmengen unter hypoxischen Bedingungen führt. Es wurden zwei Linien des Ökotyps C24 untersucht, die mit dem *AtRAP2.2* Überexpressionskonstrukt transformiert waren (Abbildung 27A und B).

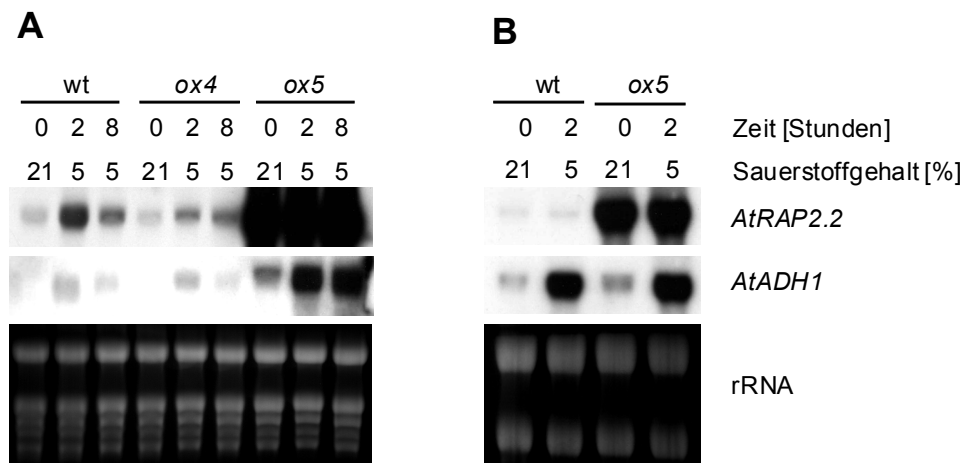


Abbildung 27: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross und in der Wurzel des Wildtyps und der Überexpressionslinien *AtRAP2.2ox4* oder *AtRAP2.2ox5*. (A) Genexpressionsanalysen im Spross von 2,5 Wochen Pflanzen des Wildtyps, *AtRAP2.2ox4* (*ox4*) oder *AtRAP2.2ox5* (*ox5*), die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden, 2 Stunden oder 8 Stunden behandelt wurden. (B) Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps und der Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox5* (*ox5*), die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden oder 2 Stunden behandelt wurden. (A und B) rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Linie *AtRAP2.2ox4* zeigte eine Corepression, während die Linie *AtRAP2.2ox5* im Vergleich zum Wildtyp eine circa 72-fache Überexpression zeigte (Abbildung 27A). Genexpressionsanalysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* in *AtRAP2.2ox5* bestätigten die Ergebnisse, die im Ökotyp Col-0 erhalten wurden. Überexpression von *AtRAP2.2* im Ökotyp C24 führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer sehr viel stärkeren Induktion der *AtADH1* Genexpression unter hypoxischen Bedingungen. Die Expression unter normoxischen Bedingungen war ebenfalls leicht erhöht. Wie beim Ökotyp Col-0 konnte dieser Effekt in Wurzeln nicht beobachtet werden. Zwischen Wildtyp und *AtRAP2.2ox5* war in Wurzeln kein Unterschied in der *AtADH1* Genexpression zu erkennen (Abbildung 27B). Die an *AtRAP2.2* Überexpressionslinien erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass *AtRAP2.2* an der Regulation von *AtADH1* unter hypoxischen Bedingungen beteiligt ist. Ob *AtRAP2.2* jedoch direkt als Transkriptionsfaktor an eine *AtADH1* Promotorsequenz bindet oder indirekt in die *AtADH1* Genregulation involviert ist, ist noch ungeklärt.

3.2.8 *AtRAP2.2* ist im Proteom der Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox3* in 2D-Gelen nicht nachweisbar

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von *AtRAP2.2* zu erhöhter *AtRAP2.2* Proteinbildung führt, wurden Proteomanalysen durchgeführt (Abbildung 28). Des Weiteren sollte überprüft werden, ob Unterschiede in den Proteomen zwischen Wildtyp und *AtRAP2.2ox3* sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Bedingungen nachweisbar sind. Durch den Vergleich der Proteome von Wildtyp und *AtRAP2.2ox3* sollte getestet werden, welche Proteine durch Überexpression von *AtRAP2.2* verändert vorliegen. Deshalb wurde lösliches Gesamtprotein aus dem Spross von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps und von *AtRAP2.2ox3* Pflanzen, die entweder mit 21% oder 5% Sauerstoff behandelt wurden, über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Um einen möglichst großen Überblick des Proteoms zu bekommen, wurde für die Auftrennung ein pH-Bereich von 3-10 NL ausgewählt. Es wurde eine biologische Kontrolle durchgeführt. Jedes Gel wurde mit 750 µg Protein beladen und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Bis auf ein Gel, in dem Protein von nicht behandelten *AtRAP2.2ox3* Pflanzen aufgetrennt wurde, war die Proteinbeladung gleichmäßig. Die ungleiche Beladung wurde bei der anschließenden Auswertung berücksichtigt.

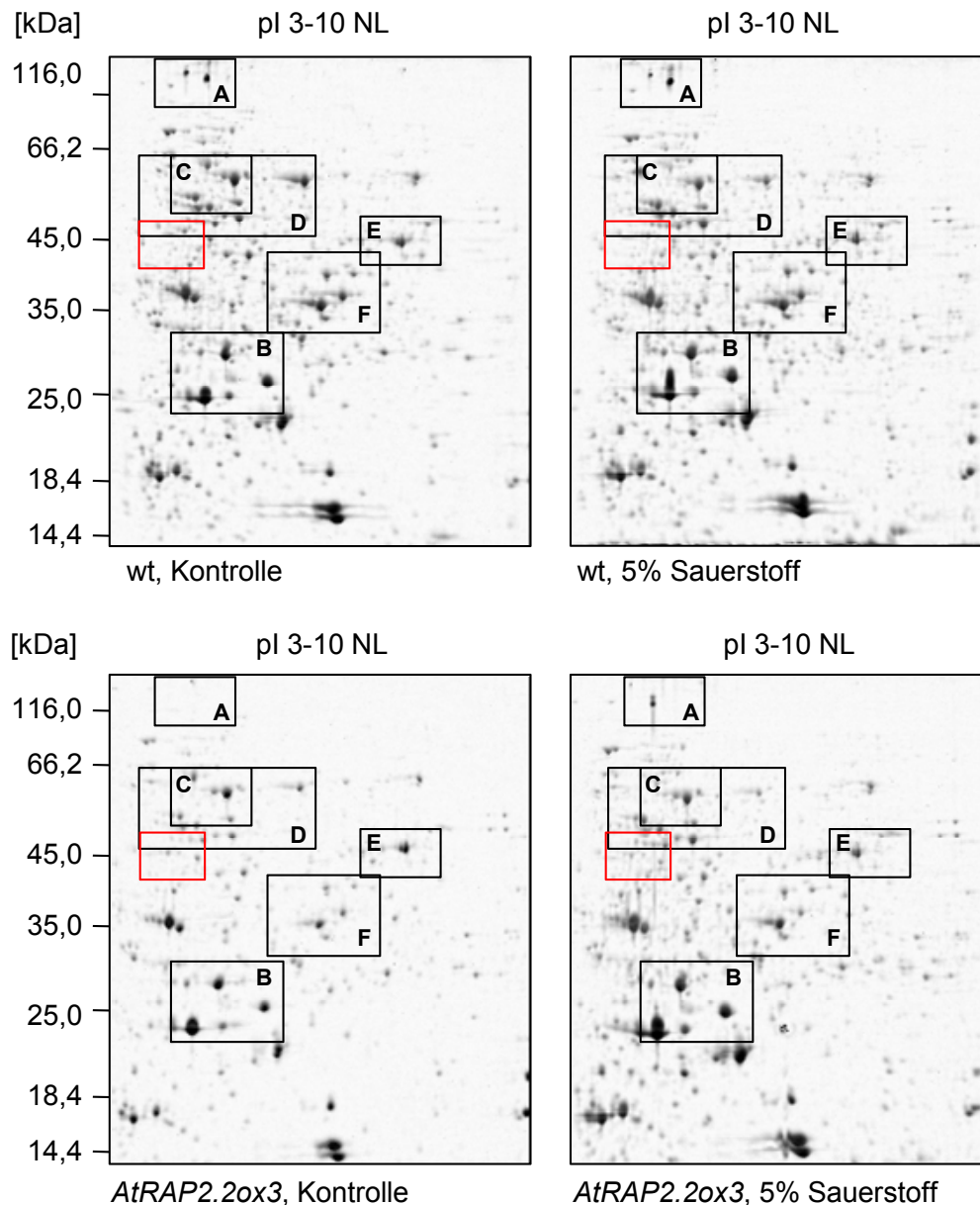


Abbildung 28: Vergleich von 2D-Gelen mit aufgetrennten Proteinen aus dem Spross von Pflanzen des Wildtyps und der *AtRAP2.2ox3* Linie. 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden mit 21% (Kontrolle) oder 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden oder 2 Stunden behandelt. 750 μ g löslicher Gesamtextrakt wurden in der ersten Dimension in einem pH Gradienten von 3-10 NL aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit kolloidalen Coomassie-Färbung. Der rot markierte Bereich entspricht vergrößerten Ausschnitten in Abbildung 29 und kennzeichnet die Bereiche, in denen AtRAP2.2 aufgrund der errechneten Masse und des pI-Wertes erwartet wurde. Mit Buchstaben gekennzeichnete Ausschnitte entsprechen vergrößerten Ausschnitten in Abbildung 30. Diese Ausschnitte zeigen hypoxieregulierte und/oder AtRAP2.2 regulierte Proteine.

Die Masse des AtRAP2.2 Proteins beträgt 42,5 kDa und der errechnete pI-Wert liegt bei 4,65. *AtRAP2.2ox3* zeigte eine 44-fache Überexpression, weshalb vermutet wurde, dass eine eventuell verstärkte AtRAP2.2 Proteinsynthese im löslichen Gesamtextrakt zu sehen sein könnte. In Abbildung 29 sind Ausschnitte aus den 2D-Gelen zu sehen, die den Bereich zeigen, in dem AtRAP2.2 nach theoretischen Berechnungen, das heißt, ohne Modifikationen zu finden sein müsste. Innerhalb dieses Bereiches wurde in der *AtRAP2.2ox3* Linie im Vergleich zum Wildtyp kein stärker abundanter Proteinspot detektiert.

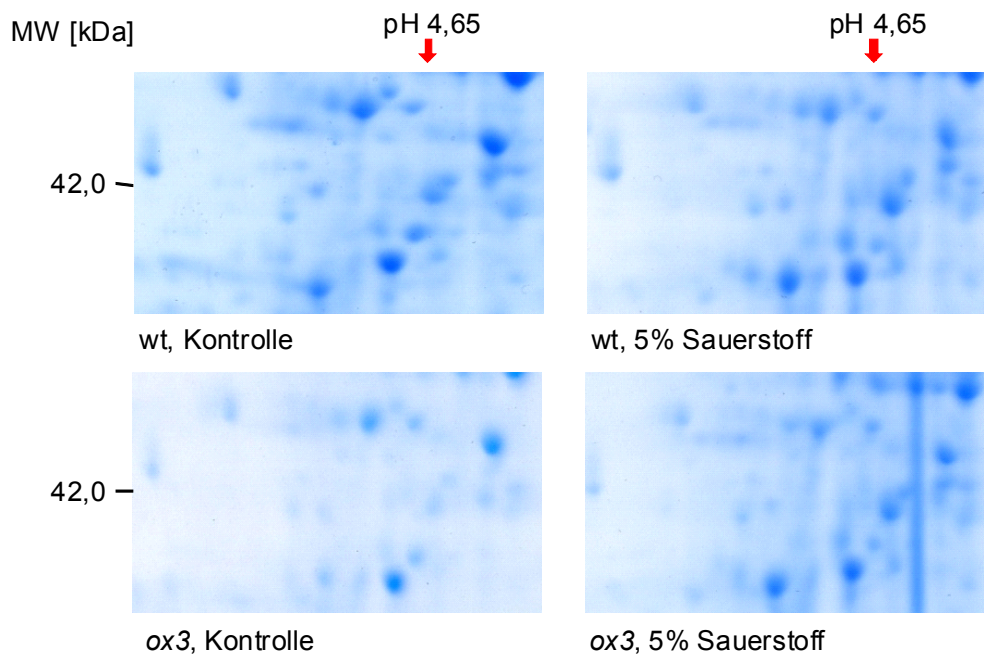


Abbildung 29: Vergleich der Proteinmuster in einem Ausschnitt aus den 2D-Gelen, in dem das AtRAP2.2 Protein nach theoretischen Berechnungen erwartet wurde. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus den 2D-Gelen, der den Bereich von 42 kDa bei einem pH-Wert von 4,65 umfasst. Abbildung 28 zeigt eine Übersicht der 2D-Gele.

Unterschiede wurden im Proteinmuster sowohl zwischen Wildtyp und *AtRAP2.2ox3* als auch im Vergleich von Kontrolle und Behandlung detektiert (Abbildung 30 A-F). Regulierte Proteinspots wurden aus den Gelen ausgestochen und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Neun signifikant identifizierte Proteine sind in Tabelle 5 aufgeführt. Sechs Proteine konnten nicht signifikant identifiziert werden.

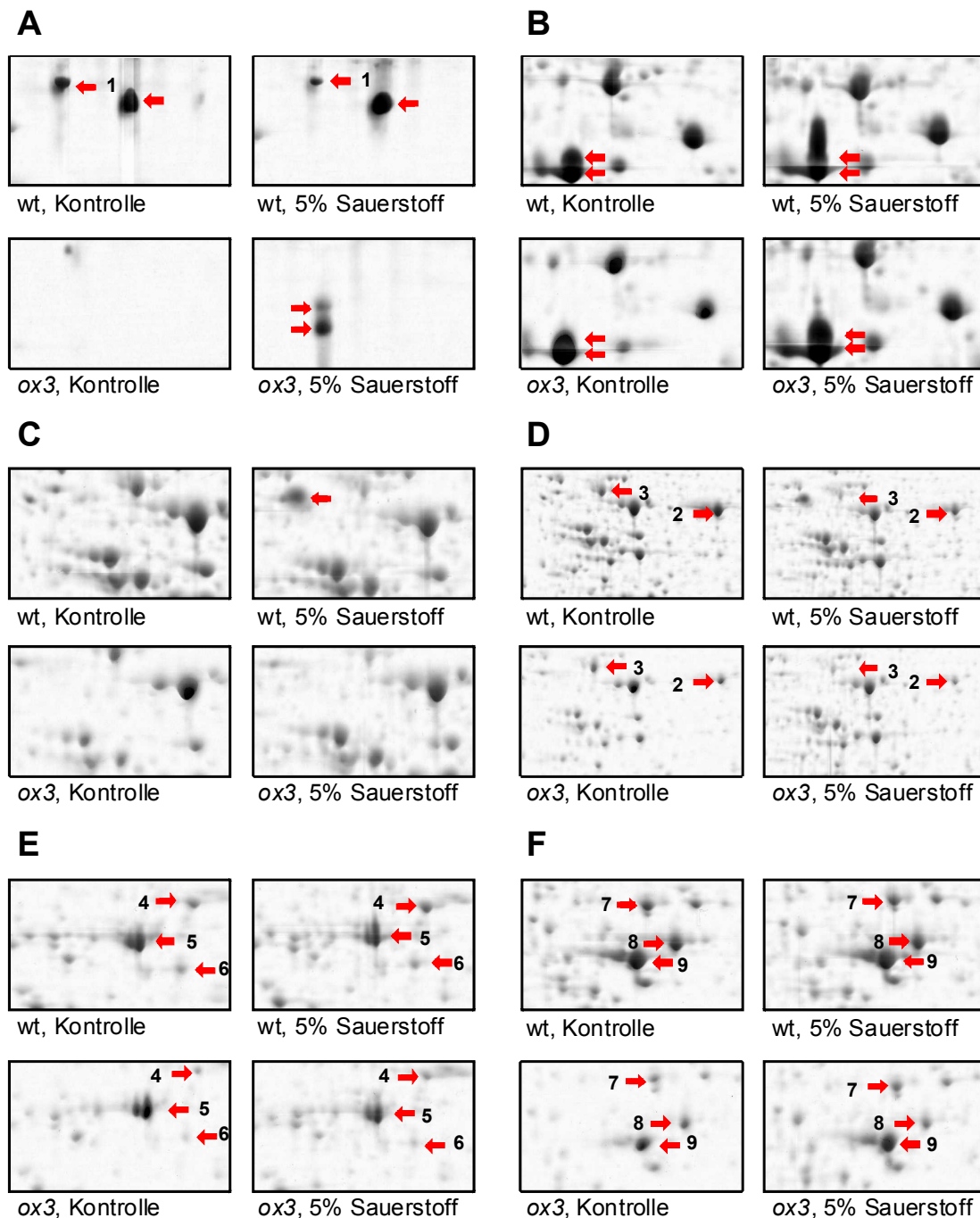


Abbildung 30: Vergleich von Proteinmustern, in denen Unterschiede detektiert wurden. (A-F) 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden mit 21% oder 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 Stunden oder 2 Stunden behandelt. 750 µg löslicher Gesamtextrakt wurden in der ersten Dimension in einem pH Gradienten von 3-10 NL aufgetrennt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit kolloidaler Coomassie-Färbung. Die dargestellten Ausschnitte entsprechen den von A bis F markierten Ausschnitten aus Abbildung 28. Rote Pfeile kennzeichnen Unterschiede im Proteinmuster. (A, D, E, F) Nummerierte Pfeile zeigen Proteinspots, die über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert und signifikant identifiziert wurden (Tabelle 5). (A, B, C) Pfeile ohne Nummern zeigen Proteinspots, die nicht signifikant identifiziert wurden. Ausschnitte wurden mit der PDQuest Software (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bearbeitet.

Identifizierte Proteine waren Ribulosebisphosphat-Carboxylase, PSBO-1 (*oxygen-evolving enhancer 33*), die alpha Untereinheit der ATP-Synthase CF1, eine Aminomethyltransferase und die cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase. Die Ribulosebisphosphat-Carboxylase wurde aus verschiedenen Bereichen der 2D-Gele identifiziert. Bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten stellte sich heraus, dass es sich dabei um proteolytische Spaltungen handelte. Ausschließlich bei der Ribulosebisphosphat-Carboxylase, die mit der Nummer 2 versehen wurde, entsprach die errechnete Masse und der errechnete pI-Wert der beobachteten Masse und dem beobachteten pI. Die theoretischen Massen und pI-Werte der ATP-Synthase und der Aminomethyltransferase konnten bestätigt werden. Bei PSBO-1 und der cytosolische Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase gab es Abweichungen zwischen den errechneten und beobachteten Werten, die auf Modifikationen zurückzuführen sein könnten. Im Wesentlichen wurden abundante Proteine im löslichen Gesamtextrakt identifiziert.

Tabelle 5: Hypoxie- und/oder AtRAP2.2 regulierte Proteine aus Arabidopsis. Regulierte Proteine aus Abbildung 30 wurden über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Der Score gibt das Maß der Wahrscheinlichkeit an, mit der es sich um das entsprechende Protein handelt. Ein Score von >64 gilt als signifikant identifiziert. Die Nummerierungen in der linken Spalte entsprechen den Nummerierungen in der linken Spalte entsprechen den Nummerierungen aus Abbildung 30. Die Regulation der Proteine ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Nr.	Protein	Zugangsnummer	MW [kDa]	pI	Score
1	PSBO-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER 33)	gi 15240013	35348,719	5,55	101,00
2	Ribulosebisphosphate carboxylase	gi 1944432	48008,18	6,13	165,00
3	ATP synthase CF1 alpha subunit	gi 7525018	55351,039	5,19	131,00
4	Aminomethyltransferase	gi 15221119	44758,898	8,55	123,00
5	Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 166706	37077,172	6,34	68,30
6	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain	gi 27752799	47920,102	6,13	85,10
7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain	gi 27752799	47920,102	6,13	66,60
8	Ribulosebisphosphate carboxylase	gi 1944432	48008,18	6,13	141,00
9	Ribulosebisphosphate carboxylase	gi 1944432	48008,18	6,13	68,50

Tabelle 6 zeigt die Regulation der identifizierten Proteine im Wildtyp und *AtRAP2.2ox3* mit und ohne Behandlung mit 5% Sauerstoff. Die Ribulosebisphosphat-Carboxylase, die CF1 alpha Untereinheit der ATP-Synthase und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase waren im Wildtyp und in *AtRAP2.2ox3* nach Hypoxie im Dunkeln herunterreguliert. PSBO-1 war im Vergleich zum Wildtyp in *AtRAP2.2ox3* sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie nicht vorhanden während die Aminomethyltransferase in *AtRAP2.2ox3* herunterreguliert war. Zusammengefasst waren im löslichen Gesamtextrakt aus Arabidopsis nur wenige regulierte, abundante Proteine detektierbar.

Tabelle 6: Übersicht der Regulation von identifizierten Proteinen. Die Nummerierungen in der linken Spalte entsprechen den Nummerierungen aus Abbildung 30 und Tabelle 5. (+) = Protein ist in dem Gel vorhanden, (-) = Protein ist in dem Gel nicht vorhanden, (↓) = Protein ist herunterreguliert.

Nr.	Protein	Wildtyp		<i>AtRAP2.2ox3</i>	
		21% O ₂	5% O ₂	21% O ₂	5% O ₂
1	PSBO-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER 33)	+	+	-	-
2	Ribulosebisphosphate carboxylase	+	+↓	+	+↓
3	ATP synthase CF1 alpha subunit	+	+↓	+	+↓
4	Aminomethyltransferase	+	+	+↓	+↓
5	Cystolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	+	+↓	+	+↓
6	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain	+	+	+↓	+↓
7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain	+	+	+↓	+↓
8	Ribulosebisphosphate carboxylase	+	+	+↓	+↓
9	Ribulosebisphosphate carboxylase	+	+	+↓	+↓

3.3 Repression von *AtRAP2.2* führt zur Repression von *AtADH1*

Um zu überprüfen, ob die Repression von *AtRAP2.2* zur Repression von *AtADH1* führt, wurden zwei verschiedene *AtRAP2.2* T-DNA Insertionslinien, SAIL_184_G12 und SALK_079603, auf Homozygotie selektiert und anschließend für Genexpressionsanalysen eingesetzt. In beiden Linien war die T-DNA Insertion im 5'-UTR lokalisiert, was zu reduzierten Transkriptmengen, jedoch nicht zu einem kompletten Ausschalten der *AtRAP2.2* Genexpression führte (Abbildung 31A, B). Aus diesem Grund wurde SAIL_184_G12 als *knock-down 1 (kd1)* und SALK_079603 als *knock-down 2 (kd2)* bezeichnet.

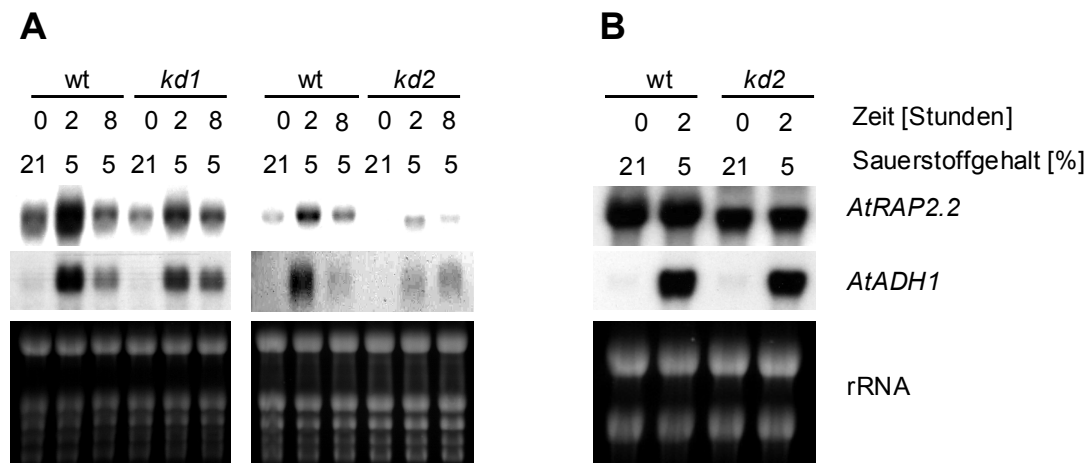


Abbildung 31: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* im Spross und in der Wurzel des Wildtyps und der *AtRAP2.2* T-DNA Insertionslinien *kd1* und *kd2*. (A) Genexpression im Spross von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps und der *AtRAP2.2* T-DNA Insertionslinien *AtRAP2.2kd1* und *AtRAP2.2kd2*, die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0, 2 oder 8 Stunden behandelt wurden. (B) Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 2,5 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps und *AtRAP2.2kd2*, die mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für 0 oder 2 Stunden behandelt wurden. (A und B) rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienen als Beladungskontrolle.

Unter normoxischen Bedingungen waren *AtRAP2.2* Transkriptmengen der T-DNA Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp sowohl im Spross als auch in den Wurzeln reduziert (Abbildung 31A, B). Beide T-DNA Insertionslinien zeigten eine schwache Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression nach Behandlung mit 5% Sauerstoff im Spross (Abbildung 31A), jedoch war wie im Wildtyp keine Induktion nach Behandlung mit 5% Sauerstoff in den Wurzeln zu beobachten (Abbildung 31B). Im Spross, aber nicht in der Wurzel, führten reduzierte *AtRAP2.2* Transkriptmengen zu einer reduzierten Induktion der *AtADH1* Genexpression unter hypoxischen Bedingungen. Diese Ergebnisse bestätigten, dass *AtRAP2.2* die Genexpression von *AtADH1* im Spross als Antwort auf Hypoxie reguliert.

3.3.1 *AtRAP2.2ox3* Keimlinge wachsen vergleichbar dem Wildtyp

AtRAP2.2 Überexpressionslinien wiesen unter Normoxie keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp auf. Es sollte überprüft werden, ob *AtRAP2.2ox3* Pflanzen phänotypische Unterschiede nach Behandlung mit 5% Sauerstoff zeigen. Für diesen Versuch wurden Keimlinge von Beginn ihrer Keimung an für vier Tage in 5% Sauerstoff unter Langtagbedingungen oder im Dunkeln angezogen. Kontrollpflanzen wurden entsprechend für vier Tage unter normoxischen Bedingungen unter Langtagbedingungen oder im Dunkeln angezogen. Anschließend wurden die Wurzel- und die Hypokotyllängen bestimmt (Abbildung 32A, B).

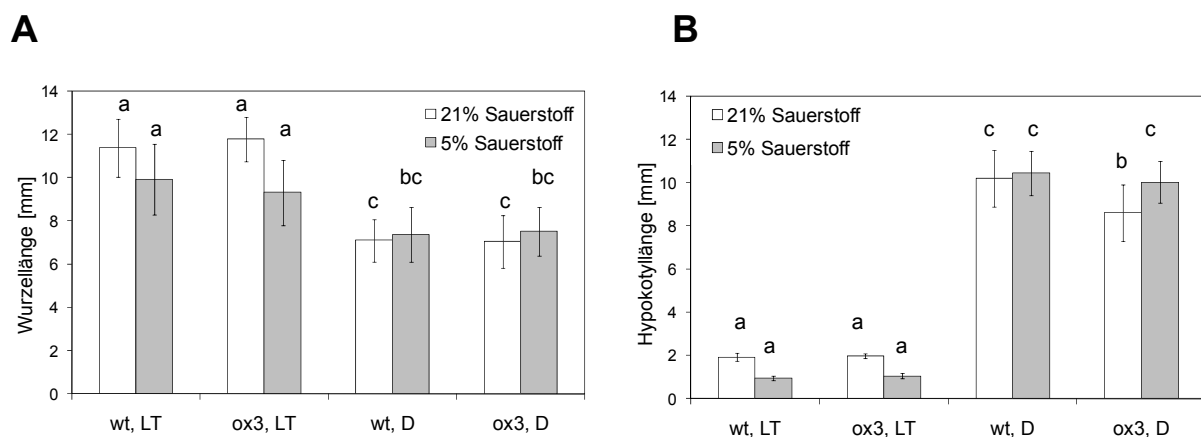


Abbildung 32: Wachstum von Wildtyp und *AtRAP2.2ox3* Keimlingen, die bei 21% oder 5% Sauerstoff im Langtag oder im Dunkeln angezogen wurden. Von 4 Tage alten Pflanzen wurde nach der Behandlung mit 21% oder 5% Sauerstoff (A) die Wurzellänge und (B) die Hypokotyllänge bestimmt. (A und B) Die Mittelwerte von n = 20 bis 50 Pflanzen sind mit einem Standardfehler angegeben. Gleiche Buchstaben kennzeichnen eine signifikante Gruppenzugehörigkeit nach einer ANOVA und einem Bonferroni-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,001$. LT = Langtag, D = Dunkel.

Bei Keimlingen, die im Langtag angezogen wurden, nahmen sowohl die Wurzel- als auch die Hypokotyllängen unter hypoxischen Bedingungen ab (Abbildung 32A, B). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,001$ war der Unterschied jedoch ausschließlich bei den Wurzellängen signifikant (Abbildung 32A). Bei etiolierten Keimlingen bewirkte ein Wachstum in 5% Sauerstoff im Vergleich zu Keimlingen, die im Langtag angezogen wurden keine Änderungen in der Wurzellänge. Insgesamt waren Wurzeln von etiolierten Keimlingen jedoch kürzer als von Keimlingen, die im Licht angezogen wurden. Die Wurzellängen von etiolierten und im Langtag angezogenen Keimlingen, die bei 5% Sauerstoff angezogen wurden, zeigten keine Unterschiede.

Die Genotypen zeigten im Wesentlichen vergleichbares Wachstum. Zwischen der Hypokotyllänge und der Wurzellänge bestanden bei Normoxie und bei Hypoxie sowohl im Licht als auch im Dunkeln keine Unterschiede. Warum *AtRAP2.2ox3* unter normoxischen Bedingungen ein kürzeres Hypokotyl zeigt, ist ungeklärt (Abbildung 32B).

Abbildung 33 zeigt beispielhaft Fotos von 4 Tage alten Keimlingen, die für die statistischen Analysen (Abbildung 32) verwendet wurden.

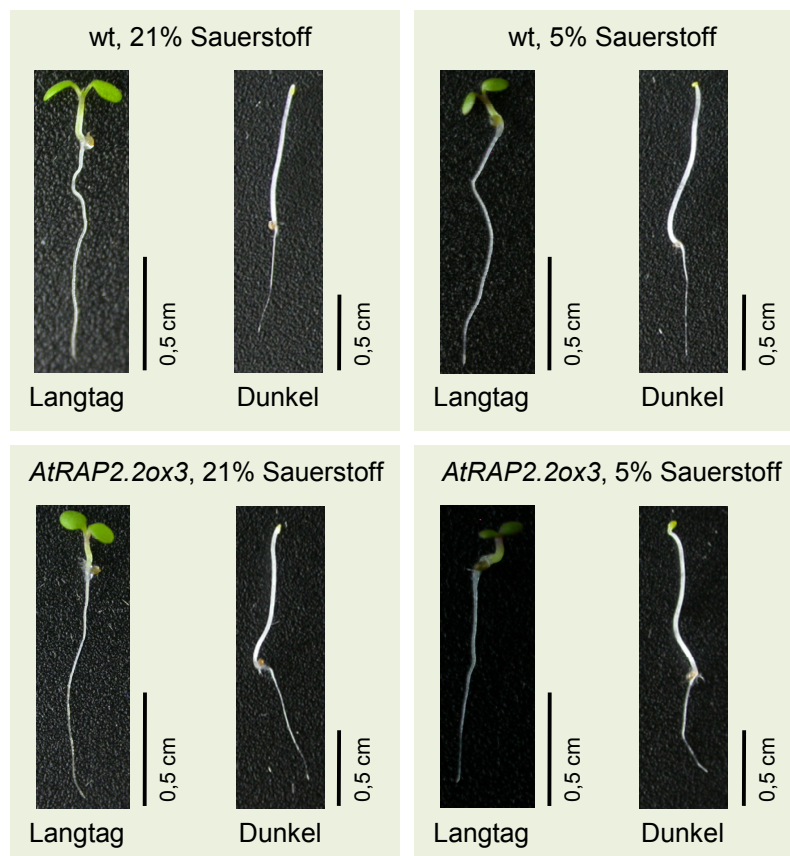


Abbildung 33: Vergleich des Wachstums von Keimlingen des Wildtyps und *AtRAP2.2ox3*. Dargestellt sind beispielhaft Fotos von 4 Tage alten Keimlingen, die bei 21% oder 5% Sauerstoff im Langtag oder im Dunkeln angezogen wurden.

3.3.2 *AtRAP2.2* wird durch H_2O_2 im Spross induziert

Bezugnehmend auf das Modell der Rop-Signaltransduktion zur Regulierung der *AtADH* Genexpression (Baxter-Burrell et al., 2002) (Abbildung 3) sollte überprüft werden, ob *AtRAP2.2* unter normoxischen Bedingungen durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) induziert werden kann (Abbildung 34).

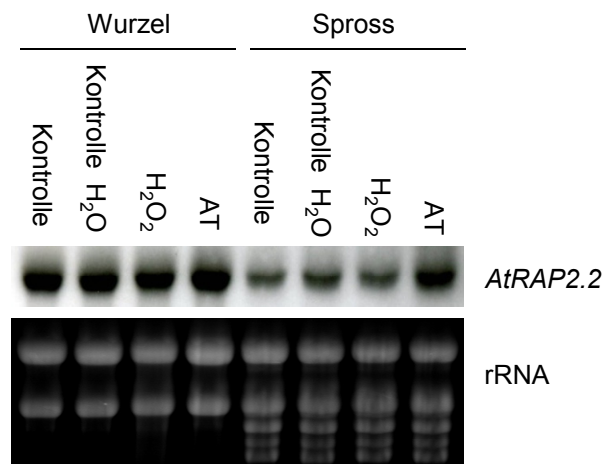


Abbildung 34: Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Aminotriazol (AT). 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden für 4 Stunden mit 0,1% H_2O_2 oder 20 mM AT behandelt. Die Pflanzen wurden stündlich besprüht. Kontrollen wurden nicht oder mit Wasser besprüht. Die *AtRAP2.2* Genexpression wurde anschließend in Wurzel und Spross untersucht. rRNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und dienten als Beladungskontrolle.

Baxter-Burrell et al. (2002) gehen davon aus, dass die *AtADH1* Genexpression nach Aktivierung der Rop-Signaltransduktion durch eine geregelte Produktion von H_2O_2 ausgelöst wird. Dem Modell fehlt ein Bindeglied zwischen der Produktion von H_2O_2 und der Induktion der *AtADH1* Genexpression. Recherchen in der Genevestigator *Microarray*-Datenbank ergaben, dass *AtRAP2.2* auch beim Prozess des programmierten Zelltodes (PCD) verstärkt exprimiert wird. H_2O_2 ist dafür bekannt, ein wesentlicher Regulator von PCD zu sein. Es wurde vermutet, dass *AtRAP2.2* als Transkriptionsfaktor auch durch die Produktion von H_2O_2 induziert werden könnte. 2,5 Wochen alte Pflanzen wurden entweder mit 0,1% H_2O_2 oder mit 20 mM Aminotriazol (AT) für vier Stunden behandelt. Für die Behandlung wurden die Pflanzen stündlich mit H_2O_2 oder AT besprüht. Kontrollen wurden entweder nicht oder mit Wasser besprüht. AT ist ein Katalaseinhibitor. Katalase spaltet H_2O_2 in H_2O und O_2 . Durch AT wird eine endogene Anreicherung von H_2O_2 bewirkt. Nach Gechev et al. (2005) kommt es innerhalb einer vierstündigen AT-Behandlung zu einer um circa zwei Drittel reduzierten Katalaseaktivität in Blättern von vier Wochen alten Arabidopsispflanzen.

Wie zuvor beschrieben waren Transkriptmengen von *AtRAP2.2* in Wurzeln höher als im Spross. Die Transkripte blieben nach Behandlung mit H₂O₂ oder AT in Wurzeln unverändert. Im Spross hingegen führte eine Behandlung mit AT zu einer Induktion der *AtRAP2.2* Genexpression. Applikation von 0,1% H₂O₂ führte jedoch nicht zu veränderter Expression (Abbildung 34). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass H₂O₂ die Genexpression von *AtRAP2.2* steuern könnte. Möglicherweise war die Konzentration von exogen appliziertem H₂O₂ zu gering, um zu wirken.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung von hypoxieregulierten Proteinen über Proteomanalytik

Aufgrund der großen Bedeutung von Reis als Kulturpflanze und des entschlüsselten Reisgenoms wurden bereits diverse Proteomanalysen in Reis durchgeführt, unter anderem mit dem Ziel, Proteome als Antwort auf abiotischen oder biotischen Stress zu untersuchen (Abbasi und Komatsu, 2004; Shen et al., 2002; Mahmood et al., 2006; Yan et al., 2006; Zang und Komatsu, 2007). Proteine, die in Antwort auf Hypoxie verändert sind, wurden bisher in Reis nicht analysiert. In dieser Arbeit wurde die Anpassung an Hypoxie in zwei unterschiedlich angepaßten Pflanzen, Reis und Arabidopsis, untersucht. Um der Frage nachzugehen, welche Proteine Anpassungen an hypoxische Bedingungen in Reis vermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit Proteomanalysen durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt, die 2D-Gelelektrophorese und die 2D-HPLC.

Wie bei früheren Proteomanalysen wurde lösliches Gesamtprotein untersucht, um einen maximalen Überblick des Proteoms zu bekommen. Die Methode der 2D-Gelelektrophorese erwies sich in dieser Arbeit als ungeeignet, um früh regulierte Proteine im löslichen Gesamtextrakt aus Reis als Antwort auf Überflutung zu detektieren. Ein Vergleich der Proteine aus nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen zeigte keine Änderungen in den 2D-Gelen. Nach Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen über 2D-HPLC waren dagegen Unterschiede in den Chromatogrammen erkennbar. Gründe dafür liegen vermutlich in den Limitationen der 2D-Gelelektrophorese (Minden, 2007; López, 2007). Ein großes Problem bei der Verwendung von löslichem Gesamtextrakt besteht zum Beispiel darin, dass sehr häufig vorkommende Proteine einen großen Anteil der gesamten Proteinmenge ausmachen können und viele regulatorische Proteine, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Liegt ein gering abundantes Protein zum Beispiel in einer Konzentration von pg ml^{-1} in der Zelle vor und ein stark abundantes Protein in einer Konzentrationen von mg ml^{-1} , heißt dies, dass ein Proteinmolekül in der Gegenwart von 1.000.000.000 anderen Molekülen detektiert werden müsste. Dieser dynamische Bereich lässt sich mit keiner Färbemethode abdecken (Lottspeich, 1999; Görg et al., 2004; Miller et al., 2006). Der dynamische Bereich der 2D-Gelelektrophorese liegt bei einer Coomassie-Färbung ungefähr bei 10^2 , bei einer Silberfärbung bei 10^3 und bei der 2D-DIGE (*differential gel electrophoresis*) Methode bei maximal 10^5 (Lopez et al., 2000; Chakravarti et al., 2005; Miller et al., 2006). Demzufolge können gering abundante Proteine nicht neben häufig vorkommenden Proteinen detektiert werden. Ein weiterer Nachteil der Auftrennung von

löslichem Gesamtextrakt liegt darin, dass stark abundante Proteine andere Proteine überlagern. Um diesem Problem entgegenzuwirken, können stark abundante Proteine über Affinitätschromatographie spezifisch aus dem löslichen Gesamtextrakt abgetrennt werden. Hierfür wird jedoch ein geeigneter Ligand benötigt. Zusätzlich können beim Abtrennen der abundanten Proteine auch einzelne gering vorkommende Proteine mit abgetrennt werden, so dass die quantitativen Verhältnisse der Probe verändert werden. Eine weitere Möglichkeit, um die Auflösung von 2D-Gelen zu erhöhen, liegt in der Verwendung von IPG-Gelen mit einem engen pH-Bereich. Eine pH-Einengung ermöglicht eine Anreicherung von Proteinen mit einem bestimmten pI und bewirkt eine Spreizung des Proteinmusters (Hoving et al., 2002; Weiss und Görg, 2007). Durch den Einsatz von überlappenden pH-Bereichen lassen sich digital sogenannte *Cyber Gele* erstellen. Eine starke Einengung des pH-Bereiches wird zumeist dann vorgenommen, wenn ein bestimmtes Protein gesucht wird, dessen pI bekannt ist. In dieser Arbeit wurde getestet, ob eine Einengung eines pH-Bereiches von 3-10 NL (nicht-linear) auf 4-7 eine bessere Auflösung ergibt und Unterschiede im Proteinmuster nach einer entsprechenden Färbung sichtbar werden. Eine Einengung des pH-Bereiches führte zwar zu einer besseren Auflösung, jedoch war diese nicht ausreichend, um Unterschiede nach einer Silberfärbung zu detektieren.

Eine Silberfärbung wurde durchgeführt, weil nach einer kolloidalen Coomassie-Färbung keine Unterschiede im Proteinmuster von nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen beobachtet wurden. Ein entscheidender Vorteil der Silberfärbung im Vergleich zur kolloidalen Coomassie-Färbung liegt in der erhöhten Empfindlichkeit. Nachteil der Silberfärbung ist hingegen die schwierigere Reproduzierbarkeit und die limitierte Quantifizierbarkeit (Miller et al., 2006). Zusätzlich sind massenspektrometrische Analysen von silbergefärbten im Vergleich zu Coomassie gefärbten Proteinen schwieriger. Es existieren zwar Protokolle für massenspektrometrisch kompatible Silberfärbungen (Blum et al., 1987; Shevchenko et al., 1996), jedoch ist eine Identifizierung oftmals mit Problemen behaftet (Richert et al., 2004; Jin et al., 2006; Chevallet et al., 2006). Die von Blum et al. (1987) und Shevchenko et al. (1996) massenspektrometrisch kompatiblen Silberfärbungen verwenden Formaldehyd zum Entwickeln des Gels, das allerdings auch Proteine vernetzt. Auch wenn gefärbte Gele zügig wieder entfärbt werden, ist die Peptidausbeute reduziert. Dass regulierte Proteine aufgrund der limitierten Quantifizierbarkeit der Silberfärbung nicht erkannt wurden, ist eher unwahrscheinlich. Im Zuge eines Workshops wurden lösliche Gesamtproteine auch mit der DIGE-Methode (Unlü et al., 1997; Tonge et al., 2001; Marouga et al., 2005) aufgetrennt und keine Unterschiede detektiert.

Eine sehr effektive Möglichkeit, gering abundante Proteine anzureichern und die Komplexität der Probe zu verringern, ist eine Subfraktionierung. In dieser Arbeit wurden Kernproteine isoliert, um Transkriptionsfaktoren mit einer möglichen Funktion bei der

Anpassung von Reis an Hypoxie zu identifizieren. Im Kernproteom konnten regulierte Proteine in 2D-Gelen nach einer SYPRO Ruby Färbung detektiert werden. SYPRO Ruby weist eine der Silberfärbung vergleichbare Sensitivität auf und hat zudem den Vorteil, massenspektrometrisch kompatibel zu sein. Regulierte Proteine wurden aus den Gelen isoliert, tryptisch gespalten und über Massenspektrometrie analysiert. Es konnte ein Protein signifikant als Zinkfingerprotein (LOC_Os09g27320) identifiziert werden. Das Protein ist nicht in der Literatur beschrieben. Ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um ein reguliertes Protein handelt, müsste über weitere Versuche überprüft werden. Es wurden drei biologische Wiederholungen durchgeführt, jedoch verlief die Auftrennung im basischen Bereich nicht in allen Gelen gleich. Probleme bei der Auftrennung von basischen Proteinen ($\text{pH} > 7$) sind in der Literatur beschrieben und lassen sich unter anderem durch die Oxidation von Cysteinen im basischen Bereich erklären. Eine Zugabe von DTT im Rehydrationspuffer sollte eine solche Oxidation zwar verhindern, jedoch ist DTT eine schwache Säure ($\text{pK}_s = 8-9$) und migriert während der isoelektrischen Fokussierung zur Anode, wodurch die reduzierende Wirkung von DTT im basischen Bereich unterbleibt (Olsson et al., 2002; Barry et al., 2003; Luche et al., 2004; Bai et al., 2005; Kane et al., 2006). Warum nicht alle isolierte Proteine aus dem Kernproteom signifikant identifiziert wurden, konnte nicht geklärt werden, weil die massenspektrometrischen Analysen zum damaligen Zeitpunkt nicht selbst durchgeführt wurden. Ein Grund für die fehlgeschlagene Identifizierung könnte eine nicht ausreichende Proteinkonzentration sein. Dieser Grund erscheint nicht besonders wahrscheinlich, weil pro Gel 200 μg Protein geladen wurden und Massenspektrometer sehr empfindlich sind. Zusammengefasst scheint eine Fraktionierung des Kernproteoms eine geeignete Methode zu sein, um regulierte Kernproteine über 2D-Gelelektrophorese zu untersuchen.

Als komplementäre Methode für die Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen aus Reis wurde in dieser Arbeit die 2D-HPLC eingesetzt. Sowohl die 2D-Gelelektrophorese als auch die 2D-HPLC weisen Vor- und Nachteile auf, weshalb die Verwendung beider Methoden ergänzende Informationen des zu untersuchenden Proteoms liefert. Im Gegensatz zur 2D-Gelelektrophorese weist die 2D-HPLC keine Einschränkung in der Auftrennung von hoch- (>150 kDa) und niedermolekularen (<10 kDa) Proteinen auf. Bei der 2D-HPLC werden die Proteine in der ersten Dimension nach dem pI und in der zweiten Dimension nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Nach einer anschließenden Auswertung der erhaltenen Chromatogramme mit der Software DeltaVue wurden Fraktionen, in denen ein Peak reguliert war, über SDS-PAGE in der dritten Dimension aufgetrennt. Durch den Vergleich der behandelten Probe mit einer Kontrolle wurden regulierte Proteine identifiziert, aus den Gelen ausgeschnitten, tryptisch gespalten und über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie analysiert. Weil silbergefärbte Proteine, aufgrund der bereits beschriebenen Problematik, massenspektrometrisch schlecht zu analysieren waren, wurden lösliche Gesamtproteine

neunfach angereichert, um Proteine mit kolloidalem Coomassie zu färben und dadurch die Peptidausbeute für die massenspektrometrischen Analysen zu erhöhen. Anstatt die Proteine in der dritten Dimension über SDS-PAGE aufzutrennen, bestände auch die Möglichkeit, Fraktionen über nano-LC/MS/MS direkt zu analysieren. Eine Quantifizierung könnte in diesem Fall mit iTRAQ™ (*isobaric tag for relative and absolute quantification*) durchgeführt werden (Ross et al., 2004; Zieske, 2006; Boehm et al., 2007; Wiese et al., 2007). Aufgrund der verwendeten dritten Dimension und der guten Bandenauflösung nach der SDS-PAGE war eine solche Analyse jedoch nicht notwendig.

Im Gegensatz zur 2D-Gelelektrophorese waren Änderungen im Proteinmuster beim Vergleich von löslichen Gesamtproteinen aus nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen mit der Methode der 2D-HPLC detektierbar. Insgesamt wurden 132 Proteine aus den SDS-Gelen eluiert, von denen 90 Proteine mittels *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) und Tandem-Massenspektrometrie identifiziert wurden, das einer Erfolgsquote von 68% entspricht. Auswertbare Spektren wurden nicht für jedes Protein erhalten. Gründe dafür sind vielfältig und könnten zum Beispiel beim tryptischen Verdau der Proteine liegen, der nicht immer optimal verläuft. Die aus den Gelstücken eluierten Peptide können auch an der Wandung des Probengefäßes adherieren. Einige durch tryptische Spaltung erhaltene Peptide sind zudem überhaupt nicht nachweisbar. Probleme treten dadurch auf, dass bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie meist im positiven Modus gemessen wird und dadurch negativ geladene und ungeladene Teilchen nicht erfasst werden. Grosse Schwierigkeiten bei der Proteinidentifizierung über Peptidmassen stellen posttranslationale Modifikationen des jeweiligen Proteins dar, weil die erhaltenen Massen von den *in-silico* generierten Peptidmassen desselben Proteins unter Umständen keine großen Übereinstimmungen besitzen und dadurch das Protein nicht allein durch MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie identifiziert werden kann. Außerdem führen posttranslationale Modifikationen oft dazu, dass eine Proteinpopulation heterogen wird und daher deren Mitglieder nur in jeweils geringen Mengen in der Probe vorhanden sein können (Mann und Jensen, 2003; Jensen, 2004).

Bei der Auflistung aller identifizierten Proteine war auffällig, dass einige Proteine teilweise mehrfach vorkamen. Ein Beispiel ist Calmodulin, das drei Mal isoliert und identifiziert wurde. Grund dafür war in diesen Fällen, dass die isolierten Proteinbanden sehr eng beieinander lagen, und sich zudem im niedermolekularen Bereich befanden, der nicht scharf aufgetrennt war. Für die statistische Auswertung wurden diese Proteine nur einfach berücksichtigt. Problematischer war vielmehr die Tatsache, dass gleiche Proteine teilweise nicht nur in einer, sondern in zwei oder sogar drei Fraktionen vorkamen. Das *ricin B-related lectin domain containing protein* und die S-Adenosylmethionin Synthetase 2 wurden zum Beispiel in zwei verschiedenen Fraktionen jeweils in der Behandlung als reguliert identifiziert und wurden für die Auswertung ebenfalls nur einfach gezählt. Zusätzlich befanden sich

weitere Proteine in zwei, beziehungsweise bei der cytosolischen Ascorbatperoxidase 1 und der cytosolischen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, sogar in drei verschiedenen Fraktionen. In diesen Fraktionen waren die entsprechenden Proteine unterschiedlich reguliert, das heißt, sie waren einmal in der Kontrolle und einmal in der Behandlung hochreguliert. Dadurch ist es schwer, eine Aussage über eine tatsächliche Regulation zu treffen. Für die Auswertung wurden Proteine, die in verschiedenen Fraktionen vorkamen und unterschiedlich reguliert waren, nicht berücksichtigt. Nach Angaben des Herstellers können diese Probleme auftauchen, wenn Proteine in sehr hohen Konzentrationen vorliegen und aufgrund der hohen Konzentration nicht schnell genug von der Säule eluiert werden. Dadurch könnten abundante Proteine in aufeinanderfolgenden Fraktionen enthalten sein. Laut Hersteller dürfte es jedoch nicht sein, dass gleiche Proteine in verschiedenen, nicht aufeinanderfolgenden Fraktionen vorkommen. Bei der cytosolischen Ascorbatperoxidase 1 zum Beispiel war aber genau das der Fall. Eine Erklärung wäre, dass die Proteine falsch identifiziert wurden. Die Identifizierung von Proteinen mittels PMF und Tandem-Massenspektrometrie erfolgt über einen Abgleich von gemessenen mit den theoretischen Massen in der Datenbank. Die Möglichkeit einer falschen Identifizierung bei der cytosolischen Ascorbatperoxidase 1 zum Beispiel erscheint deshalb unwahrscheinlich, weil der Score sehr hoch war (teilweise > 500), die molekulare Masse übereinstimmte und das Protein doppelt isoliert und unabhängig, das heißt, aus Kontrolle und Behandlung identifiziert wurde. Ähnliches gilt für die anderen Proteine. Die über 2D-HPLC identifizierten Proteine müßten nun durch weitere Analysen, zum Beispiel über 2D-Gelelektrophorese oder über Immunodetektion, überprüft werden. Regulatorische Transkriptionsfaktoren wurden aus dem Gesamtextrakt nicht identifiziert. Die Subfraktionierung erwies sich als geeignete Möglichkeit, um gering abundante Proteine wie Transkriptionsfaktoren über 2D-Gelelektrophorese zu identifizieren. Ein Subproteom mit reduzierter Komplexität und angereicherten gering abundanten Proteinen könnte auch über 2D-HPLC aufgetrennt werden. Möglicherweise könnte die beschriebene Problematik bei der Auftrennung von löslichen Gesamtproteinen über 2D-HPLC aufgrund der reduzierten Komplexität des Proteingemisches reduziert oder sogar behoben sein.

In der Literatur existieren keine vergleichbaren Proteomdaten aus Reis, die ebenfalls zum Ziel hatten hypoxisch relevante Proteine zu identifizieren. Proteomanalysen wurden unter anderem in Reis und Mais durchgeführt, um Proteine zu analysieren, die als Antwort auf Anoxie reguliert werden (Sachs et al., 1980; Sachs et al., 1996; Chang et al., 2000; Gibbs et al., 2000; Huang et al., 2005).

Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine aus Reis wurden nach deren Funktion putativ klassifiziert. Zusätzlich wurde die prozentuale Verteilung der Klassifizierungsgruppen sowie die prozentuale Verteilung in Bezug auf eine Hoch- oder Herunterregulation der

Proteine als Antwort auf Überflutung bestimmt. Eine Auswertung der klassifizierten Proteine ergab, dass 46% der Proteine in die Proteinbiosynthese involviert sind, von denen 65% nach Überflutung herunterreguliert waren. Sachs et al. (1980) detektierten in Mais als Antwort auf Anoxie 20 anaerobe Polypeptide (ANPs) und zeigten, dass die Synthese von aeroben Proteinen reprimiert ist. Chang et al. (2000) untersuchten Proteinänderungen nach hypoxischer Behandlung in Wurzelspitzen von Maiskeimlingen über 2D-Gelelektrophorese mittels einer [³⁵S]Met-Markierung und zeigten ebenfalls, dass Hypoxie die Synthese der meisten normoxischen Proteine unterdrückt und nur ein sehr geringer Prozentsatz als Antwort auf Hypoxie induziert ist. Dadurch könnte erklärt werden, warum Proteine der Proteinbiosynthese herunterreguliert waren.

Bei den hochregulierten Proteinen waren zwei Gruppen auffällig: photosynthetische Proteine, die einen Gesamtanteil von 7% aufwiesen, von denen 100% nach Überflutung induziert waren und Proteine der Gruppe „Sonstige“. Zu den photosynthetischen Proteinen gehörten das *oxygen enhancer protein 1*, die Coproporphyrinogen III Oxidase und die Ribulosebisphosphat-Carboxylase. Grund für eine Induktion der Ribulosebisphosphat-Carboxylase durch Überflutung könnte sein, dass die Pflanze verstärkt versucht, Glukose und andere organische Verbindungen herzustellen. Kohlenstoffdioxid steigt bei Hypoxie in den Pflanzenzellen an und die ATP-Versorgung wird durch die Gärung aufrechterhalten, so dass der Calvin-Zyklus weiterhin ablaufen kann. Die Coproporphyrinogen III Oxidase ist in die Biosynthese von Chlorophyll und Häm involviert. Hämoglobine werden als Antwort auf Hypoxie gebildet und wurden mit einer hypoxischen Anpassung in Verbindung gebracht (Hunt et al., 2002; Igamberdiev et al., 2005). Hämoglobine sind des Weiteren Ausgangsverbindungen für Phytochrome (Davis et al., 1999). Die Gruppe „Sonstige“ betrug 16% der gesamten Proteine, von denen 71% nach Überflutung hochreguliert waren. Zu diesen hochregulierten Proteinen gehörten Calmodulin, Villin-3, DREPP2, S-Adenosylmethionin Synthetase 2 und Ricin-B. Es wurde gezeigt, dass bei Sauerstoffmangel Ca²⁺-Konzentrationen erhöht sind (Subbaiah et al., 1994; Baxter-Burrell et al., 2002), wodurch ein erhöhter Bedarf an Calmodulin unter hypoxischen Bedingungen erklärt werden könnte. Ein Kandidat für weitere Analysen könnte DREPP2 sein, dessen Transkriptmengen bei Trockenstress in Gerste hochreguliert waren (Talamè et al., 2007) und das in dem Brassinosteroid begünstigten Pflanzenwachstum eine Rolle spielt (Tang et al., 2008). Welche Funktion die einzelnen Proteine bei der hypoxischen Antwort spielen, müsste weiter untersucht werden.

Die Gruppe der Stressantwortproteine betrug 12% aller statistisch ausgewerteten Proteine und zeigte keine einheitliche Tendenz bezüglich einer Regulation als Antwort auf Überflutung. Nach Überflutung waren das Hitzeschockprotein STI, Katalase und die stromale Ascorbatperoxidase (OsAPx6), aber nicht die cytosolische Ascorbatperoxidase (OsAPx2),

hochreguliert. Es wurde gezeigt, dass Hitzeschockproteine auch an einer Anpassung an abiotische Stressbedingungen beteiligt sein können (Liu et al., 2006). So vermittelte die Überexpression eines Hitzeschockproteins, rHsp90, eine verstärkte Salztoleranz. Eine Überexpression von sHSP17.7 führte zu einer verstärkten Toleranz gegenüber Trockenstress in Reiskeimlingen (Sato und Yokoya, 2008). Katalase und Ascorbatperoxidase fungieren als Antioxidantien bei der Detoxifizierung von H_2O_2 . Unter hypoxischen Bedingungen kommt es aufgrund des veränderten Redoxstatus zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Unter Verbrauch von NADPH entsteht durch die NADPH-Oxidase aus Sauerstoff das Superoxidradikal, das durch die Superoxiddismutase zu H_2O_2 umgewandelt wird. H_2O_2 kann zwar als Signalmolekül für eine metabolische Anpassung dienen (Baxter-Burrell et al., 2002), jedoch sind zu hohe Konzentrationen für die Pflanze schädlich, so dass detoxifizierende Enzyme aktiv werden (Blokhina et al., 2003).

Anders als in Proteomanalysen, bei denen die Anpassung an Anoxie in Mais (Fert et al., 1979; Sachs et al., 1980; Chang et al., 2000) über 2D-Gelelektrophorese mittels einer [^{35}S]Met-Markierung untersucht wurde, wurden in dieser Arbeit keine Enzyme der Gärung gefunden. Gründe dafür könnten vielfältig sein. Im Gegensatz zu Mais ist Reis besser an Sauerstoffmangel angepasst. Zudem wurde in Mais die Antwort auf Anoxie und nicht auf Hypoxie untersucht. Des Weiteren ist die Methode der [^{35}S]Met-Markierung sehr sensitiv. Sie ermöglicht die Detektion von neusynthetisierten Proteinen. Aussagen über Veränderungen im gesamten Proteom können damit nicht getroffen werden. Ein weiterer Grund für die fehlende Detektion könnte darin liegen, dass Proteomanalysen nie das komplette Proteom erfassen und ADH aus diesem Grund nicht gefunden wurde.

4.2 Proteomanalysen von *AtRAP2.2ox3* Linien

In der Überexpressionslinie *AtRAP2.2ox3* wurde kein erhöht vorhandenes Protein, das *AtRAP2.2* entsprechen könnte, detektiert. Es ist anzunehmen, dass *AtRAP2.2* trotz einer circa 44-fachen Überexpression im löslichen Gesamtextrakt immer noch nicht ausreichend abundant vorkommt, und deshalb kein erhöhtes *AtRAP2.2* beobachtet wurden. Es könnte auch sein, dass *AtRAP2.2* auf Proteinebene nicht erhöht vorliegt, was jedoch aufgrund des Phänotyps dieser Mutante unwahrscheinlich erscheint. Welsch et al. (2007) generierten einen Anti-RAP2.2 Antikörper mit der N-terminalen, 166 Aminosäuren langen Sequenz von *AtRAP2.2* und konnten keine Regulation von *AtRAP2.2* auf Proteinebene in einer 12-fachen Überexpressionslinie von *AtRAP2.2* feststellen. Der Antikörper detektierte *AtRAP2.2* bei einer Masse von circa 60 kDa. Die errechnete Masse von *AtRAP2.2* liegt bei 42,5 kDa. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in der 44-fachen *AtRAP2.2* Überexpressionslinie

Trankriptmengen von *AtADH1* wie auch die ADH-Aktivität höher waren als im Wildtyp. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine Regulation auf Proteinebene stattzufinden scheint.

Ein Vergleich der Proteome von Pflanzen des Wildtyps und *AtRAP2.2ox3*, mit und ohne hypoxische Behandlung, ergab, dass wenige Unterschiede in den Proteomen sichtbar waren. Der lösliche Gesamtextrakt scheint vermutlich viele abundante Haushaltsproteine zu enthalten, so dass regulatorische, gering abundante Proteine ohne eine entsprechende Anreicherung nicht zu detektieren waren. Die neun Proteine, die über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie signifikant identifiziert wurden, waren PSBO-1, Ribulosebisphosphat-Carboxylase, eine Untereinheit der ATP-Synthase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase und Aminomethyltransferase. Die Ribulosebisphosphat-Carboxylase wurde in verschiedenen Bereichen des 2D-Gels gefunden, zum Beispiel bei einer Masse von circa 48 kDa, die der errechneten Masse entspricht, aber auch bei einer Masse von circa 32 kDa. Die Massendifferenz von 16 kDa lässt sich dadurch erklären, dass die Ribulosebisphosphat-Carboxylase proteolytisch gespalten wurde. Eine genaue Analyse der massenspektrometrischen Daten ergab, dass die Peptidabdeckung nur über den C-terminalen Bereich erfolgte, das heißt, nur in dem Bereich von Aminosäure (AS) 172 bis circa AS 430. Dementsprechend fehlte der N-terminale Bereich von AS 1 bis AS 171. Dadurch lässt sich erklären, warum die Ribulosebisphosphat-Carboxylase auch bei einer molekularen Masse von 32 kDa beobachtet wurde. Die proteolytische Spaltung könnte die Folge einer Prozessierung sein, oder durch endogene Protease erfolgt sein, da bei der Aufarbeitung keine Proteaseinhibitoren verwendet wurden. Warum die Ribulosebisphosphat-Carboxylase, die CF1 alpha Untereinheit der ATP-Synthase und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase im Wildtyp und in *AtRAP2.2ox3* nach Hypoxie im Dunkeln herunterreguliert waren, ist ungeklärt. Ebenso die Beobachtung, dass PSBO-1 im Vergleich zum Wildtyp in *AtRAP2.2ox3* nicht vorhanden und die Aminomethyltransferase herunterreguliert war. Hierfür müssten weitere Analysen erfolgen. Zusammengefasst waren im löslichen Gesamtextrakt aus Arabidopsis nur wenige regulierte, abundante Proteine detektierbar. Für ein weiteres Screening empfiehlt es sich, wie in Reis, eine Fraktionierung vorzunehmen.

4.3 Regulation von *AtADH1* in Arabidopsis

Das Gen der Alkoholdehydrogenase 1 (*AtADH1*) ist ein Modellgen, an dem einige *cis*- und *trans*-Elemente, welche die Promotoraktivität kontrollieren, bereits identifiziert wurden (Ferl und Laughner, 1989; Dolferus et al., 1994; Hoeren et al., 1998). Eines der *cis*-Elemente ist eine G-Box (5'-CCACGTGG-3'), an die der *G-box binding factor* (GBF) bindet (DeLisle und Ferl, 1990b). Möglicherweise könnte auch AtMYC2 an die G-Box des *AtADH1* Promotors binden, weil diese eine MYC-Erkennungssequenz enthält (CANNTG). Zusätzlich existieren

zwei weitere MYC-Erkennungssequenzen im *AtADH1* Promotor, weshalb nicht geklärt ist, an welche Sequenz(en) AtMYC2 bindet. Weitere *cis*-Elemente im *AtADH1* Promotor wurden von Dolferus et al. (1994) identifiziert. Dazu gehört ein *anaerobic responsive element* (ARE), das aus einem GT- (5'-AACCAA-3') und einem GC-Motiv (5'-GCCC-3') besteht. Des Weiteren wurde durch gerichtete Mutagenese herausgefunden, dass innerhalb des Promotors weitere Regionen für die Regulation der *AtADH1* von Bedeutung sind. Diese enthalten sowohl mögliche Repressorbindestellen (-964 bis -510) als auch positive regulatorische Elemente (510 bis -384) (Dolferus et al., 1994).

Die Genexpression von *AtADH1* wird als Antwort auf Sauerstoffmangel induziert (Sachs et al., 1980; Dolferus et al., 2003; Fukao und Bailey-Serres, 2004). Liu et al. (2005) untersuchten die Kinetik der Induktion der *AtADH1* Genexpression als Antwort auf Hypoxie und stellten eine erhöhte Transkriptmenge nach 30 Minuten Hypoxie sowie eine maximal erhöhte Transkriptmenge von *AtADH1* nach zwei Stunden Hypoxie fest. Die Ergebnisse von Liu et al. (2005) konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Innerhalb einer halben Stunde hypoxischer Behandlung lagen *AtADH1* Transkriptmengen erhöht vor. Maximal erhöhte Transkriptmengen von *AtADH1* wurden im Spross nach zwei Stunden Hypoxie beobachtet. Eine Induktion der *AtADH1* Genexpression erfolgt auch durch andere abiotische Stressfaktoren wie Kälte und Trockenheit sowie durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) (Dolferus et al., 1994; De Bruxelles et al., 1996; Hoeren et al., 1998). Dolferus et al. (1994) zeigten, dass einige *cis*-Elemente wichtig für die Induktion der *AtADH1* Genexpression als Antwort auf alle Stressbedingungen sind, während andere *cis*-Elemente stressspezifisch sind. Verschiedene *trans*-Faktoren, die als Antwort auf den jeweiligen Stress verfügbar werden, könnten mit den individuellen *cis*-Elementen agieren, um die *AtADH1* Geninduktion als Antwort auf die entsprechende Stressbedingung zu vermitteln (Paul und Ferl, 1997).

Für die Induktion der Genexpression von *AtADH1* als Antwort auf Sauerstoffmangel sind das GT- und das GC-Motiv essentiell. Hoeren et al. (1998) identifizierten den Transkriptionsfaktor *AtMYB2*, der an das GT-Motiv bindet. *AtMYB2* wird durch alle Stressfaktoren induziert, die auch zur Induktion der Genexpression von *AtADH1* führen. Yoo et al. (2005) zeigten, dass *AtMYB2* neben der für MYB-Transkriptionsfaktoren typische R2R3-MYB DNA-Bindedomäne auch eine Calmodulin-Bindedomäne aufweist. *AtMYB2* könnte möglicherweise aufgrund erhöhter cytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen durch die RopGAP4 vermittelte Signaltransduktion induziert werden (Baxter-Burrell et al., 2002). MYB-Transkriptionsfaktoren gehören zu einer Multigenfamilie mit mehr als 80 Vertretern in *Arabidopsis* (Kranz et al., 1998). Die Funktion vieler MYB-Transkriptionsfaktoren ist noch unbekannt. Es könnte sein, dass eine funktionelle Redundanz innerhalb der MYB-Transkriptionsfaktoren existiert, und dass auch andere MYB-Transkriptionsfaktoren an das

GT-Motiv des *AtADH1* Promotors binden. Unklar ist auch, ob ein MYB-Transkriptionsfaktor spezifisch bei Sauerstoffmangel agiert. Die Induktion der Transkriptmengen von *AtMYB2* ist als Antwort auf Trockenstress und ABA am stärksten (Hoeren et al., 1998). Es wäre möglich, dass ein anderer MYB-Transkriptionsfaktor spezifisch als Antwort auf Sauerstoffmangel an das GT-Motiv binden könnte. Ein solcher MYB-Transkriptionsfaktor könnte *AtMYB96* sein (Abbildung 35). *Microarray*-Analysen ergaben, dass *AtMYB96* stärker und schneller als *AtMYB2* als Antwort auf Sauerstoffmangel induziert wird (Klok et al., 2002). Die in dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse bestätigte eine starke Induktion von *AtMYB96* innerhalb einer Stunde als Antwort auf Sauerstoffmangel.

Bei Mutation des GC-Motivs konnte *AtMYB2* die P_{AtADH1} :GUS Expression in Protoplasten aus *Arabidopsis*-Mesophyllzellen nicht aktivieren. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass die anaerobe Induktion des *AtADH1* Promotors nicht nur *AtMYB2* und das GT-Motiv, sondern einen zweiten Faktor benötigt, der an das GC-Motiv bindet (Hoeren et al., 1998). Bisher ist noch kein *trans*-Fraktor bekannt, der an das GC binden könnte. ERF-Transkriptionsfaktoren binden an Sequenzen, die sehr GC-reich sind und als GCC-Boxen (5'-AGCCGCC-3') bezeichnet werden (Hao et al., 1998). Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass der ERF-Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* möglicherweise an das GC-Motiv binden und dadurch die *AtADH1* Genexpression aktivieren könnte. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von Welsch et al. (2007) publiziert, dass *AtRAP2.2* spezifisch an ein ATCTA-Motiv bindet. Dieses ATCTA-Motiv wurde ursprünglich in Promotoren der Phytoen-Synthase und Phytoen-Desaturase identifiziert (Welsch et al., 2003). Beide Enzyme sind in die Carotinoidbiosynthese involviert. Das ATCTA-Element befindet sich auch im *AtADH1* Promotor 21 bp von der TATA-Box entfernt. Eine Datenbankrecherche ergab, dass dieses Motiv ausnahmslos in allen untersuchten Promotoren willkürlich ausgewählter Gene zu finden war. Offenbar spielen deshalb andere Einflüsse eine Rolle, welche die DNA-Proteininteraktion steuern. Eine spezifische Bindung von *AtRAP2.2* an das ATCTA-Motiv könnte von anderen zusätzlichen Sequenzmotiven abhängen und/oder von einer Interaktion mit einem oder mehreren weiteren Proteinen, die abhängig von den jeweiligen Bedingungen zur Verfügung stehen. Diese Interaktion könnte direkt oder indirekt erfolgen. Es wäre auch denkbar, dass nicht das ATCTA-Element für die Bindung von *AtRAP2.2* zuständig ist, sondern ein anderes Element aus der von Welsch et al. (2007) verwendeten Sonde mit der Sequenz 5'-CAATCTAAATATCTAAAATATAAA-3'. Sowohl die CAATC-Sequenz, die TAAAT(ATCTA)-Sequenz als auch die ATATAAA-Sequenz sind im Promotor von *AtADH1* enthalten. Die letzte Sequenz entspricht der TATA-Box. Um zu überprüfen, an welche Sequenz *AtRAP2.2* tatsächlich bindet, könnten *Electro Mobility Shift Assays* (EMSAs) mit verschiedenen Sonden, die unterschiedliche potentielle *cis*-Elemente enthalten, und gerichtete Mutagenesen durchgeführt werden.

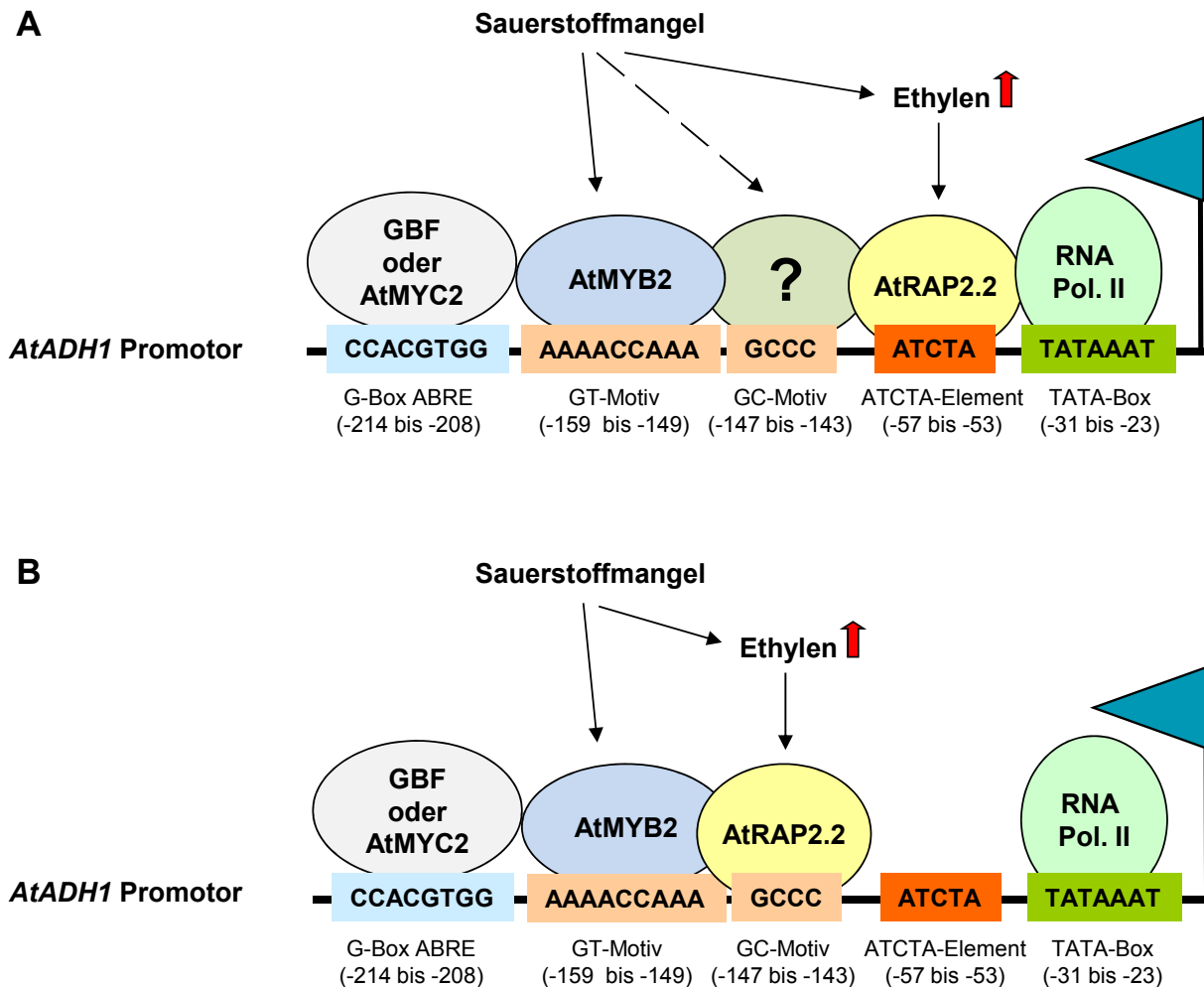


Abbildung 35: Vereinfachte und hypothetische Modelle der Genregulation von *AtADH1* durch *AtRAP2.2* und weitere *trans*-Faktoren im Spross. Dargestellt ist der *AtADH1* Promotor und bekannte *cis*- und mögliche *trans*-Elemente, die an der Regulation des *AtADH1* Promotors beteiligt sein können. In beiden Modellen wird *AtMYB2* erst durch Sauerstoffmangel verfügbar und bindet daraufhin an das GT-Motiv. Die Biosynthese von *AtRAP2.2* benötigt Ethylen und wird durch ein hypoxisches Signal weiterhin verstärkt. Das Vorhandensein von *AtMYB2* und *AtRAP2.2* führt zur Induktion der Genexpression von *AtADH1* unter hypoxischen Bedingungen. (A) *AtRAP2.2* induziert die Genregulation von *AtADH1*, indem *AtRAP2.2* an das ATCTA-Motiv bindet und darüber hinaus mit einem unbekanntem Faktor interagiert, der an das GC-Motiv bindet und mit *AtMYB2* interagiert, das an das GT-Motiv bindet. (B) *AtRAP2.2* induziert die Genregulation von *AtADH1*, indem es an das GC-Motiv bindet. (A und B) Die G-Box enthält eine MYC-Erkennungssequenz (CANNTG), an die *AtMYC2* binden könnte. GBF ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in der Lage ist, an die G-Box zu binden. Die RNA-Polymerase II Maschinerie wird durch die in dieser Abbildung nicht dargestellten generellen Transkriptionsfaktoren TBP und TAF an der TATA-Box positioniert.

Im Modell der Rop-Signaltransduktion führt die Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins zu erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen, die eine NADPH-Oxidase

stimulieren. NADPH fördert die Bildung von H_2O_2 , wodurch schließlich das Gen der *AtADH1* induziert wird (Baxter-Burrell et al., 2002). Dieses Modell beinhaltet kein Bindeglied zwischen der Produktion von H_2O_2 und der Induktion der Expression von *AtADH1*, das heißt, es sind keine Transkriptionsfaktoren bekannt, die durch H_2O_2 reguliert werden. Um zu überprüfen, ob der Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* ein Bindeglied zwischen H_2O_2 und der Genregulation von *AtADH1* darstellen könnte, wurden Transkriptmengen von *AtRAP2.2* nach exogener Applikation und endogener Anreicherung von H_2O_2 untersucht. Im Spross führte eine exogene Applikation von H_2O_2 zu keiner Erhöhung der Transkriptmengen von *AtRAP2.2*. Die Inhibierung der Katalaseaktivität durch den spezifischen Inhibitor Aminotriazol, die zu einer Anreicherung von H_2O_2 im Gewebe führen sollte, erhöhte jedoch die *AtRAP2.2* Expression. Gründe für die unterschiedlich hohen Transkriptmengen von *AtRAP2.2* nach exogener Applikation und endogener Anreicherung von H_2O_2 könnten darin liegen, dass die zelluläre Konzentration bei einer exogenen Applikation von H_2O_2 entweder nicht hoch genug, oder zu hoch war, um *AtRAP2.2* zu induzieren. Im ersten Fall würde es bedeuten, dass H_2O_2 nicht zum Wirkungsort in der Zelle gelangte, das heißt, dass der Prozess der Diffusion nicht ausreichte, um zum Beispiel die Kutikula oder die Zellwand zu permeieren. Im zweiten Fall hieße es, dass *AtRAP2.2* nicht auf zu hohe H_2O_2 -Konzentrationen reagiert. Um herauszufinden, warum eine exogene Applikation nicht zu erhöhten Transkriptmengen von *AtRAP2.2* führte, könnte die H_2O_2 -Konzentration in der Zelle bestimmt werden. Eine Konzentrationsreihe von H_2O_2 könnte Aufschluß über eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der *AtRAP2.2* Regulation durch H_2O_2 zeigen. Um die Interaktion zwischen H_2O_2 , *AtRAP2.2* und *AtADH1* zu untersuchen, könnten Katalase-Überexpressionslinien und Katalase-Nullmutanten genutzt werden. Da *AtRAP2.2* nach einer internen Anreicherung von H_2O_2 induziert war, ist es denkbar, dass *AtRAP2.2* ein Bindeglied zwischen H_2O_2 und der *AtADH1* Genregulation in dem von Baxter-Burrell et al. (2002) aufgestellten Modell darstellt. Die durch hypoxische Bedingungen erhöhten H_2O_2 -Gehalte führten in diesem Fall zu einer Erhöhung der Ethylenbiosynthese, wodurch es zur Genexpression von *AtRAP2.2* käme und *AtRAP2.2* mit anderen Faktoren die Promotoraktivität von *AtADH1* regulierte. Diese Hypothese müsste durch weitere Analysen überprüft werden.

Peng et al. (2001) zeigten, dass Ethylen in die Regulation der Genexpression von *AtADH1* involviert ist. Für die Induktion der Genexpression von *AtADH1* wird ein Ethylensignal zwar benötigt, ist jedoch alleine nicht ausreichend (Peng et al., 2001). In dem Modell der Rop-Signaltransduktion von Baxter-Burrell et al. (2002) wird die Rolle von Ethylen in die Genexpression von *AtADH1* nicht erläutert. Die von Peng et al. (2001) beschriebene ethylenabhängige Regulation der Genexpression von *AtADH1* wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz von Ethylensignalmutanten und Ethyleneffektoren bestätigt. Die Ethylenregulation der Genexpression von *AtADH1* ist abhängig von einem hypoxischen

Signal. Ein Transkriptionsfaktor, der diese ethylenabhängige Regulation vermitteln könnte, war bisher jedoch nicht beschrieben. Der in dieser Arbeit charakterisierte AP2/ERF Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* könnte der Transkriptionsfaktor sein, der die ethylenabhängige Regulation von *AtADH1* steuert.

4.4 Die Rolle von *AtRAP2.2* bei der ethylenvermittelten Anpassung an Hypoxie im Spross von *Arabidopsis*

AtRAP2.2 ist ein ERF/AP2 Transkriptionsfaktor, der zur Subgruppe VII der Familie der ERF-Transkriptionsfaktoren gehört (Nakano et al., 2006). Behandlungen mit den Effektoren Ethephon, das bei zellulärem pH-Wert Ethylen freisetzt, und ACC, der biologischen Vorstufe von Ethylen, führten zu einer Induktion der Transkriptmengen von *AtRAP2.2*. In der *ctr1* Mutante, die eine konstitutive Ethylenantwort aufweist, waren Transkriptmengen von *AtRAP2.2* ebenfalls erhöht. In den ethyleninsensitiven Mutanten *ein2-1* und *ein3-1* waren Transkriptmengen von *AtRAP2.2* unter hypoxischen Bedingungen reprimiert, jedoch nicht komplett ausgeschaltet. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass *AtRAP2.2* zu einem geringen Maß auch konstitutiv transkribiert wird, und Ethylen die Expression von *AtRAP2.2* erhöht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Hypoxie im Dunkeln die ethylenabhängige Regulation der *AtRAP2.2* Genexpression verstärkte.

Zwei Transkriptionsfaktoren mit der größten Sequenzähnlichkeit zu *AtRAP2.2*, *AtRAP2.12* und *AtRAP2.3*, wurden ebenfalls bezüglich ihrer Regulation durch Ethylen und Sauerstoffmangel untersucht. *AtRAP2.12* wurde weder durch Ethylen noch durch Sauerstoffmangel reguliert. Transkriptmengen von *AtRAP2.3* lagen in *ctr1* erhöht und in *ein2-1* sowie *ein3-1* erniedrigt vor, was auf Regulation von *AtRAP2.3* durch Ethylen hindeutet. Anders als *AtRAP2.2* war *AtRAP2.3* jedoch nicht früh als Antwort auf Sauerstoffmangel bei Dunkelheit induziert. Eine leichte Erhöhung der Transkriptmengen von *AtRAP2.3* wurde nur in der *ctr1* Mutante nach acht Stunden Hypoxie beobachtet. Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die frühe ethylenabhängige Regulation der *AtRAP2.2* Genexpression als Antwort auf Hypoxie im Dunkeln spezifisch für dieses Gen zu sein scheint. Es ist nicht ausgeschlossen, dass *AtRAP2.3* an der späteren Antwort auf Ethylen beteiligt ist. Über die Funktion von *AtRAP2.12* ist wie die über *AtRAP2.2* wenig bekannt. *AtRAP2.3* ist bereits besser charakterisiert. Büttner und Singh (1997) zeigten, dass *AtRAP2.3*, auch als AtEBP oder ERF72 bezeichnet, mit dem bZIP (*basic-region leucin zipper*) Transkriptionsfaktor OBF4 (*osc element binding factor*) interagiert und spezifisch an die GCC-Box bindet. GCC-Boxen befinden sich in Promotoren in einer Anzahl von PR-Genen (*pathogenesis-related*), deren Expression als Antwort auf Pathogenbefall induziert ist. Das *osc*-Element (*octopine synthase*) wird von Pathogenen wie

Agrobacterium tumefaciens genutzt, um pflanzliche Gene zu regulieren. *Osc*-Elemente regulieren auch die Expression von pflanzlichen GST-Promotoren (Glutathion-S-Transferase) (Chen et al., 1996). Ellis et al. (1987) untersuchten die Rolle von *osc* als *enhancer* der Genexpression von *ZmADH1* in Mais und stellten fest, dass in Anwesenheit eines *osc*-Elementes die Transkription von *ZmADH1* erhöht war. *ZmOBF3.1* ist unter anderem in der Lage, schwach an eine G-Box/ABRE Sequenz zu binden (Foley et al., 1993). Ob *AtRAP2.3* unter bestimmten Bedingungen möglicherweise auch an das GC-Motiv und *OBF4* an die G-Box im *AtADH1* Promotor binden könnten, ist offen.

Es ist bekannt, dass Ethylen als Antwort auf Pathogenbefall oder Verwundung synthetisiert wird und die Genexpression von ERFs induziert, die als Transkriptionsfaktoren die Genexpression von PR-Genen regulieren (Argandona et al., 2001; Fischer und Dröge-Laser, 2004; Zhang et al., 2004). Eine solche Rolle scheint auch *AtRAP2.3* zu spielen, indem es an GCC-Boxen von PR-Genen bindet und deren Expression reguliert. Ogawa et al. (2005) zeigten, dass eine Überexpression von *AtRAP2.3* zu einer Hochregulation von Genen führt, die in die Pathogenabwehr involviert sind. Des Weiteren verleiht eine Überexpression von *AtRAP2.3* Tabakzelllinien Resistenz gegenüber H_2O_2 und Hitzebehandlung (Ogawa et al., 2005). Recherchen in der *Microarray*-Datenbank Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch) ergaben, dass Transkriptmengen von *AtRAP2.2* beim Prozess des programmierten Zelltods (PCD) induziert sind. Eine Form des PCD ist die Hypersensitivitätsreaktion (HR), die als Antwort auf Befall mit einem inkompatiblen Erreger einsetzt. H_2O_2 ist ein zentrales Molekül der Pathogenabwehr, indem es PCD auslöst. Unter anderem löst H_2O_2 die Expression von Genen aus, deren Produkte antioxidative Wirkung haben oder Antioxidantien bilden und deren Bildung die Größe der Nekrose begrenzen könnte. Des Weiteren induziert H_2O_2 die Expression von PR-Genen (Levine et al., 1994; Dangl et al., 1996; Király et al., 2008). Interessanterweise führte eine Überexpression von *HvRAF* (*Hordeum vulgare root abundant factor*) in Arabidopsis zu einer verstärkten Pathogenresistenz und Salztoleranz. *HvRAF* weist die größte Sequenzähnlichkeit zu *AtRAP2.2* in Arabidopsis auf. Transkriptmengen von *HvRAF* sind unter anderem durch Salicylsäure, Ethephon und Methyljasmonat induziert (Jung et al., 2006). Diese Hormone sind auch an der HR beteiligt (Raffaele et al., 2006; Mur et al., 2008). Methyljasmonat ist bekannt dafür, pflanzliche Abwehrmechanismen als Antwort auf Pathogene, aber auch auf abiotischen Stress wie Trockenheit, Kälte und Salinität zu aktivieren (Cheong und Choi, 2003; Wasternack, 2007). Ferner waren in *35S:HvRAF* Arabidopsispflanzen Gene induziert, die mit einer Stressantwort in Verbindung stehen. Unter diesen Genen befanden sich PR-Gene. Die Beobachtungen, dass *AtRAP2.2* durch H_2O_2 induziert werden kann, das eine zentrale Rolle beim PCD spielt und *HvRAF* in Arabidopsis Pathogenresistenz vermittelt, deuten auf weitere Funktionen von *AtRAP2.2* zusätzlich zu der Anpassung an Hypoxie hin. Ob *AtRAP2.2* in weiteren

ethylenregulierten Prozessen wie zum Beispiel in der Pathogenabwehr eine Rolle spielt, bleibt zu untersuchen.

Wenn Ethylen an der Hypoxieantwort mitwirkt, wäre zu erwarten, dass Pflanzen, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind, vermehrt Ethylen produzieren. Bei Überflutung akkumuliert Ethylen im pflanzlichen Gewebe aufgrund der geringen Diffusionsrate von Sauerstoff in das umgebende Medium (Armstrong, 1979). In Reis ist zusätzlich die Ethylenbiosynthese erhöht (Cohen und Kende, 1987; Mekhedov und Kende, 1996; Zarembinski et al., 1997; Zhou et al., 2002). Sollte Ethylen in Arabidopsis in der Hypoxieantwort eine Rolle spielen, müsste die Ethylenbiosynthese bei geringen Sauerstoffkonzentrationen erhöht sein. Peng et al. (2001) zeigten, dass Arabidopsispflanzen, die mit 5% Sauerstoff behandelt werden, eine höhere Ethylenproduktion aufweisen als unbehandelte Pflanzen. Innerhalb von vier Stunden hypoxischer Behandlung stieg die Ethylenbiosynthese von 2,5 Wochen alten Arabidopsispflanzen stark an und blieb bis 16 Stunden relativ konstant. (Peng et al., 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführten Ethylenmessungen ergaben, dass die Ethylenproduktion von 2,5 Wochen alten Arabidopsispflanzen nach zwei Stunden Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln anstieg, nach acht Stunden auf nicht detektierbare Werte zurückfiel. Dieser temporäre Ethylenanstieg korrelierte mit den erhöhten Transkriptmengen von *AtRAP2.2*. Ergänzend muss hinzugefügt werden, dass sich die in dieser Arbeit gemessenen Ethylengehalte nach zwei Stunden hypoxischer Behandlung nahe am Detektionslimit befanden. Peng et al. (2005) zeigten, dass Gene der ACC-Synthasen (*ACS*), *ACS2*, *ACS6*, *ACS7* und *ACS9*, als Antwort auf Hypoxie induziert werden. Liu et al. (2005) untersuchten über *Microarray Screening* Gene, die als Antwort auf Hypoxie reguliert waren. Eines dieser regulierten Gene war das Gen der ACC-Oxidase 1 (*AtACO1*) (At2g19590), das innerhalb einer Stunde circa 8-fach induziert war und dessen Transkriptmengen bis zu 24 Stunden Hypoxie erhöht vorlagen. Hochregulierte Transkriptmengen der *AtACO1* liegen auch in Pflanzen vor, die *AtMYC2* und *AtMYB2* überexprimieren. Der *AtACO1* Promotor weist sowohl eine MYC- als auch eine MYB-Erkennungssequenz auf (Abe et al., 2003). Eine erhöhte Ethylenbiosynthese als Antwort auf Hypoxie könnte somit auf die transkriptionelle Regulation dieser Gene zurückzuführen sein. In Rumexarten wurde gezeigt, dass ACC-Gehalte nach Überflutung zwar erhöht vorliegen, die Umwandlung von ACC zu Ethylen durch die ACO jedoch zum limitierenden Faktor wird (Vriezen et al., 1999). Wie stark die Sauerstoffkonzentration in überfluteten Rumexpflanzen abfiel, wurde nicht bestimmt. In Arabidopsis wurde bisher die ACO-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen nicht gemessen, so dass keine Aussage bezüglich einer Limitierung der ACO unter diesen Bedingungen getroffen werden kann. Bisher ist nicht beschrieben ab welcher Sauerstoffkonzentrationen oder ACC-Konzentration die ACO-Aktivität zum limitierenden Faktor wird.

4.5 AtRAP2.2 induziert *AtADH1* möglicherweise in Kooperation mit einem weiteren Protein

Northern Blot Analysen von *AtRAP2.2* und *AtADH1* nach Behandlung mit 5% Sauerstoff im Dunkeln für unterschiedliche Zeitpunkte zeigten eine ähnliche Expressionskinetik beider Gene. Durch den Einsatz von *AtRAP2.2* Überexpressions- und Repressionslinien wurde gezeigt, dass *AtRAP2.2* die metabolische Anpassung an Hypoxie reguliert. Welsch et al. (2007) untersuchten in *AtRAP2.2* Überexpressionslinien den Einfluss auf die Genexpression der Phytoen-Synthase und Phytoen-Desaturase und stellten fest, dass Transkriptmengen sowohl im Spross als auch in Kalli unverändert blieben. Eine Überexpression von *AtRAP2.2* hatte des Weiteren keine Auswirkung auf den Carotenoid- und Chlorophyllgehalt. Unter hypoxischen Bedingungen wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass die Überexpression von *AtRAP2.2* zu erhöhten Transkriptmengen von *AtADH1* im Spross führte. Diese gingen mit erhöhter *AtADH1* Enzymaktivität einher.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Überexpression von *AtRAP2.2* nur unter hypoxischen Bedingungen zu einer starken Induktion der Transkriptmengen von *AtADH1* führte, scheint es wahrscheinlich, dass *AtRAP2.2* mit einem anderen Protein interagiert, welches ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen verfügbar ist. Unter normoxischen Bedingungen scheint dieser Faktor zu fehlen, so dass eine Aktivierung der Genexpression von *AtADH1* unterbleibt. Nach dieser Hypothese sind beide Faktoren für die Regulation der *AtADH1* Genexpression notwendig. Ein denkbarer Kandidat wäre *AtMYB2*, der nur unter hypoxischen Bedingungen induziert ist und der an das GT-Motiv des *AtADH1* Promotors bindet (Hoeren et al., 1998). Ein weiterer Kandidat könnte *AtMYB96* sein, dessen Transkriptmengen innerhalb einer Stunde als Antwort auf Hypoxie induziert werden, von dem aber nicht bekannt ist, ob auch er an das GT-Motiv des Promotors von *AtADH1* bindet. Um zu testen, ob die Induktion der Transkriptmenge von *AtADH1* durch *AtRAP2.2* von *AtMYB2* oder *AtMYB96* abhängig ist, wäre die Generierung einer *35S:AtRAP2.2/Atmyb2* oder *35S:AtRAP2.2/Atmyb96* Doppelmutante oder einer *35S:AtRAP2.2/Atmyb2/Atmyb96* Dreifachmutante hilfreich. Des Weiteren könnten die Transkriptmengen von *AtADH1* in einer *35S:AtRAP2.2/35S:AtMYB2* Mutante untersucht werden, um zu überprüfen, ob sie im Vergleich zum Wildtyp oder zur *35S:AtRAP2.2* Einfachmutante erhöht vorliegen.

Dass GBF oder *AtMYC2* einen putativen Kandidaten darstellen, der unter normoxischen Bedingungen limitierend für die Genexpression von *AtADH1* ist, scheint eher unwahrscheinlich. Zum einen ist nicht bekannt, ob diese beiden Transkriptionsfaktoren bei Hypoxie reguliert sind, und zum anderen ist nach Dolferus et al. (1994) die G-Box für die Genregulation von *AtADH1* unter hypoxischen Bedingungen nicht relevant. Eine Mutation innerhalb der G-Box hatte keinen Einfluss auf die Genexpression von *AtADH1* unter

hypoxischen Bedingungen, sondern ausschließlich bei der Induktion von *AtADH1* als Antwort auf Kälte und Trockenheit. *AtMYC2* scheint zusätzlich bei der Induktion der Transkriptmengen von *AtADH1* durch ABA eine Rolle zu spielen (Abe et al., 2002).

Sollte *AtRAP2.2* an das ATCTA-Motiv im *AtADH1* Promotor binden, müsste vermutlich ein weiterer, bisher unbekannter Faktor an der Genregulation von *AtADH1* beteiligt sein. Hoeren et al. (1998) zeigten, dass eine Mutation innerhalb des GC-Motivs die Induktion von *AtADH1* durch *AtMYB2* reprimierte. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass *AtMYB2* für die komplette Aktivierung des Gens der *AtADH1* eine Assoziation mit einem weiteren Protein benötigt, welches an das GC-Motiv bindet (Hoeren et al., 1998). Alternativ wäre es denkbar, dass *AtRAP2.2* anstatt an das ATCTA-Element oder ein weiteres unbekanntes Element an das GC-Motiv im *AtADH1* Promotor bindet (Abbildung 35). Das GC-Motiv (GCCC) stellt nur ein halbes GCC-Element (AGCCGCC) dar, weshalb nicht die vollen Voraussetzungen für eine Bindung gegeben sind. *Electro Mobility Shift Assays* (EMSA) und gerichtete Mutagenese könnten Aufschluss darüber geben, welche *cis*-Elemente für die Regulation von *AtADH1* durch *AtRAP2.2* erforderlich sind.

Bisher ist nur ein direkter Interaktionspartner von *AtRAP2.2* bekannt, der jedoch nicht in Verbindung mit der Genregulation von *AtADH1* steht. Welsch et al. (2007) identifizieren mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screenings den *AtRAP2.2* Interaktionspartner SEVEN IN ABSENTIA IN ARABIDOPSIS2 (*SINAT2*), ein RING Zinkfingerprotein, das in die proteasomalvermittelte Degradierung von Proteinen involviert ist. Eine genaue Funktion von *SINAT2* ist bisher nicht beschrieben.

Um zu überprüfen, ob die Expression von *AtADH1* von *AtRAP2.2* abhängt, wurden *AtRAP2.2* T-DNA Insertionslinien eingesetzt. Welsch et al. (2007) beobachteten keine reduzierten *AtRAP2.2* Transkriptmengen im Spross der *AtRAP2.2* T-DNA Insertionsmutanten. In der Veröffentlichung ist nicht angegeben, um welche T-DNA Insertionslinien es sich handelte. Ergebnisse dieser Arbeit zeigten hingegen, dass Transkriptmengen von *AtRAP2.2* in den *AtRAP2.2* T-DNA Insertionsmutanten unter normoxischen Bedingungen sowohl im Spross als auch in der Wurzel im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren. In den *knock-down* Linien waren Transkriptmengen von *AtADH1* im Spross unter hypoxischen Bedingungen im Dunkeln induziert, jedoch blieben die Transkriptmengen unter denen, die im Wildtyp beobachtet wurden. Um zu klären, ob *AtRAP2.2* essentiell für die Genregulation von *AtADH1* ist, wären vollständige *knock-out* Mutanten von *AtRAP2.2* hilfreich. Zudem könnten *Atrap2.2/Atmyb2*, *Atrap2.2/Atmyb96* Doppelmutanten oder *Atrap2.2/Atmyb2/Atmyb96* Dreifachmutanten Aufschluss darüber geben, ob diese Transkriptionsfaktoren von Relevanz für die Genregulation von *AtADH1* sind.

4.6 Der Einfluss von Licht auf die Genregulation von *AtRAP2.2* und *AtADH1*

Um der Frage nachzugehen, ob *AtRAP2.2* und *AtADH1* bei Licht und Dunkelheit unterschiedlich reguliert werden, wurde die Expression der beiden Gene in *ctr1* und *ein2* unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen bei Licht und Dunkelheit untersucht. Die Genexpression von *AtRAP2.2* wird in erster Linie durch Ethylen reguliert, das heißt, dass *AtRAP2.2* sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Bedingungen durch Ethylen induziert wird. Unter normoxischen Bedingungen hat die ethylenabhängige Induktion von *AtRAP2.2* jedoch keine Auswirkungen auf die Genexpression von *AtADH1*, weil für die Genregulation von *AtADH1*, wie bereits erklärt, ein hypoxisches Signal benötigt wird. Anders ausgedrückt, unter normoxischen Bedingungen scheint ein Cofaktor für die Induktion der Genexpression von *AtADH1* zu fehlen.

Im Wildtyp und in *ein2* wird *AtRAP2.2* nur bei Dunkelheit induziert. In *ctr1* war *AtRAP2.2* auch im Licht induziert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Ethylenbiosynthese bei Dunkelheit ansteigt. Thain et al. (2004) zeigten, dass *AtACS5* im Dunkeln exprimiert war. Yamagami et al. (2003) bestimmten die Wechselzahl (*turnover number* kcat) für alle *AtACS* Isoenzyme. *AtACS5* wies im Vergleich zu den anderen Isoenzymen eine erhöhte, jedoch keine maximale Wechselzahl auf. *AtACS5* könnte aufgrund dessen stärker zur Ethylenbiosynthese beitragen als andere Isozyme mit einer niedrigeren Wechselzahl. Wang et al. (2005) untersuchten über Promotor-GUS Analysen die Promotoraktivität von *AtACS4*, *AtACS5* und *AtACS7*. P_{AtACS4} :GUS-Aktivität und P_{AtACS7} :GUS-Aktivität waren sowohl durch Dunkelheit als auch durch Ethylen induzierbar. Rieu et al. (2005) zeigten, dass in nicht gefluteten *Rumex palustris* Pflanzen im Dunkeln die Ethylenproduktion circa 3-fach erhöht war als im Licht. Transkriptmengen von *RpACS1* waren ebenfalls im Dunkeln erhöht. Aus diesem Grund vermuteten Rieu et al. (2005), dass *RpACS1* für die erhöhte Ethylenbildung bei Dunkelheit verantwortlich ist.

Die im Dunkeln induzierte Expression von *AtRAP2.2* scheint somit durch Ethylen hervorgerufen zu werden. Der Grund warum Dunkelheit die Genexpression von *AtRAP2.2* in der *ctr1* Mutante nicht weiter verstärkt, ist vermutlich, dass ein Ethylensignal schon vorhanden, das Signal sozusagen bereits „gesättigt“ ist und die durch Dunkelheit erhöhte Ethylenbiosynthese das schon vorhandene Ethylensignal nicht weiter verstärkt. Die Genexpression von *AtRAP2.2* kann in der *ctr1* Mutante durch Hypoxie nur im Dunkeln, jedoch nicht im Licht verstärkt werden. Für Wildtyp und die *ein2* Mutante trifft das nicht zu. In diesen Genotypen erhöht Hypoxie die Transkriptmenge von *AtRAP2.2* weder im Licht noch im Dunkeln. Dieser komplizierte Sachverhalt könnte sich folgendermaßen erklären lassen: die Transkriptmenge von *AtRAP2.2* könnte nur dann durch Hypoxie im Dunkeln erhöht

werden, wenn das Ethylensignal so stark wie bei der *ctr1* Mutante ist. Im Wildtyp und in der *ein2* Mutante scheint die durch Dunkelheit erhöhte Ethylenbiosynthese zu keinem ausreichend starken Ethylensignal zu führen. Für maximal erhöhte Transkriptmengen von *AtRAP2.2* sind demzufolge drei Faktoren entscheidend: ein starkes Ethylensignal, Hypoxie und Dunkelheit.

Lin et al. (2008) charakterisierten kürzlich *AtRAP2.4*, einen weiteren Transkriptionsfaktor der DREB-Subfamilie der AP2/ERF Familie. Wie Transkriptmengen von *AtRAP2.2* sind Transkriptmengen von *AtRAP2.4* bei Dunkelheit induziert. Zusätzlich sind Transkriptmengen von *AtRAP2.4* bei Salz- und Trockenstress erhöht. 4 Tage alte *35S:AtRAP2.4* Keimlinge hatten bei Rot- und Blaulicht ein kürzeres Hypokotyl als Wildtyp (Lin et al., 2008). Des Weiteren lagen in *35S:AtRAP2.4* Pflanzen Transkriptmengen von *PR3*, *PR4* und *PDF1.2* im Vergleich zum Wildtyp erhöht vor. Erhöhte Transkriptmengen von *PDF1.2* wurden auch in *35S:HvRAF* beobachtet. *AtRap2.4* ist in der Lage, sowohl an GCC-Boxen von PR-Genen als auch an DRE (*dehydration-responsive element*) zu binden (Lin et al., 2008).

Auch die Genregulation von *AtADH1* unterliegt bei hypoxischen Bedingungen einem Lichteinfluss, wenn, wie bei der *ctr1* Mutante, ein ausreichend starkes Ethylensignal vorhanden ist. Unter hypoxischen Bedingungen waren in der *ctr1* Mutante Transkriptmengen von *AtADH1* im Vergleich zum Wildtyp sowohl im Licht als auch im Dunkeln erhöht. Unter hypoxischen Bedingungen lagen im Dunkeln in der *ctr1* Mutante jedoch höhere Transkriptmengen von *AtADH1* vor als im Licht. Erhöhte Transkriptmengen von *AtADH1* im Dunkeln in der *ctr1* Mutante lassen sich dadurch erklären, dass Transkriptmengen von *AtRAP2.2* unter diesen Bedingungen erhöht vorliegen, und dass *AtADH1* durch *AtRAP2.2* reguliert wird.

4.7 Physiologische Relevanz von *AtRAP2.2* bei der Anpassung an Hypoxie

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der AP2/ERF Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* die Genregulation von *AtADH1* reguliert. Die Alkoholdehydrogenase wird in Arabidopsis von einem Gen kodiert. Die alkoholische Gärung ist bei Sauerstoffmangel essentiell für die Aufrechterhaltung des Metabolismus. *AtADH1* Nullmutanten zeigten eine geringe Überlebensrate nach Behandlung mit 5% Sauerstoff (Ellis et al., 1999). Nach Dolferus et al. (1994) ist *AtADH1* bei Sauerstoffmangel besonders in Wurzeln induziert, jedoch auch zu einem geringeren Ausmaß im Spross. Die in dieser Arbeit durchgeführten $P_{AtRAP2.2}$:GUS-Analysen zeigten, dass *AtRAP2.2* in Wurzeln stärker exprimiert war als im Spross. Northern Blot Analysen bestätigten dieses Ergebnis.

Ellis et al. (1999) beobachteten, dass Wurzel und Spross von *Arabidopsis* unterschiedliche Mechanismen der Toleranz gegenüber hypoxischem Stress aufweisen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl *AtADH1* als auch *AtRAP2.2* in Wurzeln und Spross unterschiedlich reguliert sind. Wurzeln sind die Organe der Pflanze, die als erstes von Staunässe und damit von Sauerstoffmangel betroffen sind, weshalb die alkoholische Gärung vornehmlich in Wurzeln stattfindet. Unter normoxischen Bedingungen versorgt die Wurzel den Spross mit Wasser und Nährstoffen. Unter hypoxischen Bedingungen kann die Energieversorgung beschränkt sein, weshalb im Spross ebenfalls eine metabolische Anpassung existiert. Der Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* ist an der Genregulation von *AtADH1* beteiligt. Im Spross von *35S:AtRAP2.2* Pflanzen waren Transkriptmengen von *AtADH1* und *AtADH* Enzymaktivitäten nach hypoxischer Behandlung erhöht. Eine Repression der Transkriptmengen von *AtRAP2.2* reprimierte auch Transkriptmengen von *AtADH1*. In Wurzeln waren Transkriptmengen von *AtRAP2.2* konstitutiv. Zudem hatten in Wurzeln eine Überexpression sowie ein *knock-down* von *AtRAP2.2* keinen Einfluss auf Transkriptmengen von *AtADH1*. Der Grund, dass *AtRAP2.2* Mutanten keinen Einfluss auf die Transkriptmengen von *AtADH1* in Wurzeln hatten, könnte darin liegen, dass *AtRAP2.2* Gehalte in Wurzeln bereits gesättigt und Transkriptmengen von *AtADH1* maximal erhöht vorlagen. Eine Steigerung der Transkriptmengen von *AtADH1* durch eine Überexpression von *AtRAP2.2* wäre in diesem Fall nicht mehr zu erzielen. Auch eine Repression von *AtRAP2.2* wäre nach dieser Hypothese nicht effizient genug, weil *AtRAP2.2* immer noch über dem erforderlichen Minimum vorläge, um eine maximale Genexpression von *AtADH1* hervorzurufen. Eine weitere Möglichkeit, warum in den *AtRAP2.2* Mutanten kein Einfluss auf die Genregulation von *AtADH1* in der Wurzel beobachtet wurde, besteht darin, dass die Genregulation von *AtADH1* durch weitere Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Diese Transkriptionsfaktoren könnten zu *AtRAP2.2* redundant sein und dafür sorgen, dass die alkoholische Gärung nicht unterbunden wird. Dadurch könnte die alkoholische Gärung in Wurzeln fein gesteuert werden, um hypoxischen Stress zu überleben. Um zu überprüfen, ob *AtRAP2.2* für die Genregulation der *AtADH1* in Wurzeln essentiell ist, müssten *AtRAP2.2 loss-of-function* Mutanten eingesetzt werden.

Es scheint, dass nur unter bestimmten Bedingungen der alkoholischen Gärung im Spross eine Rolle zukommt. Maximale Transkriptmengen von *AtRAP2.2* und damit auch von *AtADH1* lagen dann vor, wenn ein ausreichend starkes Ethylensignal, Dunkelheit, das bedeutet keine Photosynthese, und Hypoxie vorhanden waren. Enzymaktivität von *AtADH* wurde unter diesen Bedingungen nicht gemessen und wäre noch nachzuholen. Es ist zu vermuten, dass die Enzymaktivität von *AtADH* unter diesen Bedingungen höher wäre im Wildtyp und niedriger als in *35S:AtRAP2.2* Pflanzen, entsprechend der beobachteten Transkriptmengen von *AtADH1*. Warum Pflanzen erhöhte Transkriptmengen von *AtADH1*

unter diesen extremen Bedingungen, sprich Ethylen, Dunkelheit, Hypoxie, aufweisen, könnte folgenden Grund haben: Hypoxie und Dunkelheit bringen die Pflanze in eine sehr schlechte Lage, sie kann nicht atmen und auch keine Photosynthese mehr betreiben. Wie in den Wurzeln könnten auch im Spross Energiereserven in die alkoholische Gärung investiert werden, um den Stoffwechsel der Pflanze aufrechtzuerhalten.

Die Arbeit konnte dazu beitragen, den Mechanismus der ethylenabhängigen Genregulation von *AtADH1* besser zu verstehen. Das Phytohormon Ethylen reguliert über den ERF-Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* die Umstellung des Stoffwechsels auf alkoholische Gärung.

5 Zusammenfassung

Überflutung ist ein abiotischer Stressfaktor, der das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen beeinflusst. Bisher ist nicht geklärt, wie Sauerstoffmangel von Pflanzen wahrgenommen wird und welche Signalkomponenten Anpassungen an hypoxische Bedingungen vermitteln. In dieser Arbeit wurden Proteom- und Genexpressionsanalysen durchgeführt, um Komponenten zu identifizieren, die als Antwort auf Hypoxie reguliert werden. Als Modellorganismen fungierten Reis und Arabidopsis, die sich in Bezug auf ihre Hypoxietoleranz unterscheiden. Reis ist eine semi-aquatische Pflanze, die durch metabolische und morphologische Anpassungen anhaltende Überflutungsperioden überleben kann. In Arabidopsis sind morphologische Anpassungsstrategien weniger gut ausgeprägt. Eine Umstellung des Metabolismus von Atmung auf Gärung findet, wie in Reis, auch in Arabidopsis statt, jedoch kann Arabidopsis Sauerstoffmangel nur kurzzeitig tolerieren.

In Reis wurden Proteomanalysen über zweidimensionale Gelelektrophorese und über zweidimensionale HPLC mit anschließender SDS-PAGE durchgeführt, um Proteine zu identifizieren, die als Antwort auf Überflutung reguliert sind. Beim Vergleich von löslichen Gesamtproteinen aus nicht gefluteten und gefluteten Pflanzen, waren Änderungen im Proteinmuster nur mit der Methode der 2D-HPLC nachweisbar. Im Kernproteom konnten dagegen über 2D-Gelelektrophorese veränderte Proteinmuster nachgewiesen werden. Die regulierten Proteine wurden über MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie identifiziert und in verschiedene funktionelle Gruppen putativ klassifiziert. Den größten Anteil hatten Proteine der Proteinbiosynthese und der Stressantwort. Während im löslichen Gesamtextrakt keine Transkriptionsfaktoren gefunden wurden, konnte im Kernproteom ein putativer Transkriptionsfaktor, ein Zinkfingerprotein, identifiziert werden, der bei Überflutung induziert wird.

In Arabidopsis wurde der AP2/ERF-Transkriptionsfaktor *AtRAP2.2* (At3g14230) untersucht, der zur Subgruppe VII der ERF-Subfamilie gehört. Northern Blot Analysen ergaben, dass *AtRAP2.2* im Spross durch Ethylen reguliert wird. Hypoxie verstärkte die ethylenabhängige Induktion von *AtRAP2.2* im Spross. In der *ctr1* Mutante, die eine konstitutive Ethylenantwort zeigt, war *AtRAP2.2* erhöht. In der ethyleninsensitiven (*ein2*) Mutante war *AtRAP2.2* reprimiert. Arabidopsis besitzt ein Alkoholdehydrogenase-Gen, *AtADH1*. Unter hypoxischen Bedingungen erhöhte sich im Spross die Transkriptmenge von *AtADH1* parallel zur Transkriptmenge von *AtRAP2.2*. Die Induktion von *AtADH1* bei Hypoxie wurde durch Ethylen verstärkt. Verstärkte *AtADH1* Expression wurde auch in der *ctr1* Mutante beobachtet. Überexpression von *AtRAP2.2* führte zu Überexpression von *AtADH1* und zu erhöhter ADH Enzymaktivität bei Hypoxie. Repression von *AtRAP2.2* reprimierte die

Expression von *AtADH1* unter hypoxischen Bedingungen. Zusammengefasst lässt sich schließen, dass Ethylen über AtRAP2.2 das Schlüsselenzym der alkoholischen Gärung, ADH, steuert und damit zur metabolischen Anpassung an Hypoxie beiträgt.

6 Summary

Flooding is an abiotic stress that affects plant growth and development. It is not known how plants sense oxygen deprivation and how this signal is mediated to induce adaptations to hypoxia. In this work proteome and gene expression analyses were carried out to identify genes and proteins which are regulated in response to hypoxia. Rice and Arabidopsis differ in terms of their hypoxic tolerance and were used as model plants in this study. Rice is a semi-aquatic plant which is well adapted to survive prolonged periods of submergence due to metabolic and morphological adaptations. Morphological adaptations are less pronounced in Arabidopsis. Arabidopsis is however capable of switching its metabolism from respiration to fermentation as is rice.

Proteome analysis was performed using two-dimensional gel electrophoresis and two-dimensional HPLC (2D-HPLC) combined with SDS-PAGE to identify proteins which are regulated in response to submergence in rice. Comparison of the protein expression patterns from non-submerged and submerged rice plants showed that differences were detectable only using 2D-HPLC. Regulated proteins were identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and were putatively classified into functional groups. Proteins involved in protein biosynthesis and stress responses were most abundant. While no transcription factors were identified from total soluble extract a submergence-induced zinc finger protein likely representing a transcription factor was identified in the nuclear subproteome by two-dimensional gel electrophoresis.

In Arabidopsis, regulation of alcohol dehydrogenase by the AP2/ERF transcription factor *AtRAP2.2* (At3g14230) was studied. Northern Blot analysis revealed that *AtRAP2.2* is regulated by ethylene in the shoot. Hypoxia promoted the ethylene-dependent induction of *AtRAP2.2*. Transcript levels of *AtRAP2.2* were also highly increased in the *ctr1* mutant which shows a constitutive ethylene response and were reduced in the ethylene insensitive mutant *ein2*. The alcohol dehydrogenase is encoded by a single gene in Arabidopsis, *AtADH1*. At hypoxic conditions kinetics of *AtADH1* transcript abundance paralleled those of *AtRAP2.2*. Hypoxic induction of *AtADH1* was further increased by ethylene. Elevated expression of *AtADH1* was also observed in the *ctr1* mutant supporting the idea, that *AtADH1* was regulated by ethylene. Overexpression of *AtRAP2.2* led to overexpression of *AtADH1* and to increased ADH enzyme activity at hypoxic conditions. Repression of *AtRAP2.2* reduced the expression of *AtADH1* at hypoxic conditions. It is concluded that ethylene regulates the key enzyme of alcoholic fermentation, ADH, through *AtRAP2.2* thus contributing to metabolic adaptation to hypoxia.

7 Literatur

- Abbasi FM, Komatsu S (2004) A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4: 2072-2081.
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
- Adams DO, Yang SF (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 170-174.
- Ahmed N, Rice GE (2005) Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815: 39-50.
- Alexeeva S, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ (2003) Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol* 185: 204-209.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker JR (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 284: 2148-2152.
- Argandoña VH, Chaman M, Cardemil L, Muñoz O, Zúñiga GE, Corcuera LJ (2001) Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley. *J Chem Ecol* 7: 53-68.
- Argueso CT, Hansen M, Kieber JJ (2007) Regulation of ethylene biosynthesis. *JPGR* 26: 92-105.
- Armstrong W (1979). Aeration in higher plants. *Adv Bot Res* 7: 225-232.
- Bai F, Liu S, Witzmann FA (2005) A "de-streaking" method for two-dimensional electrophoresis using the reducing agent tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride and alkylating agent vinylpyridine. *Proteomics* 5 (8): 2043-2047.
- Banga M, Slaa EJ, Blom C, Voeselek L (1996) Ethylene biosynthesis and accumulation under drained and submerged conditions (a comparative study of two *Rumex* species). *Plant Physiol* 112: 229-237.
- Barry RC, Alsaker BL, Robison-Cox JF, Dratz EA (2003) Quantitative evaluation of sample application methods for semipreparative separations of basic proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 24: 3390-3404.

- Baxter-Burrell A, Yang Z, Springer PS, Bailey-Serres J (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Science* 296: 2026-2028.
- Benavente LM, Alonso JM (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in Arabidopsis. *Mol Biosyst* 2: 165-173.
- Bergersen FJ, Turner GL, Gibson AH, Dudman WF (1976) Nitrogenase activity and respiration of cultures of *Rhizobium* spp. with special reference to concentrations of dissolved oxygen. *Biochim Biophys Acta* 444: 164-174.
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12: 8711-8721.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6: 317-339
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 91: 179-194.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boehm AM, Pütz S, Altenhöfer D, Sickmann A, Falk M (2007) Precise protein quantification based on peptide quantification using iTRAQ. *BMC Bioinformatics* 8: 214.
- Bomblies K (2000) Whole mount GUS staining. In D Weigel, J Glazebrook, eds, *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 243–245.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bretscher A, Weber K (1979) Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2321-2325.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA.
- Büttner M, Singh KB (1997) Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5961-5966.

- Chakravarti B, Gallagher SR, Chakravarti DN (2005) Difference gel electrophoresis (DIGE) using CyDye DIGE fluor minimal dyes. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 10: Unit 10.23.
- Chandra NR, Kumar N, Jeyakani J, Singh DD, Gowda SB, Prathima MN (2006) Lectindb: a plant lectin database. *Glycobiology* 16: 938-946.
- Chang C, Meyerowitz EM (1986) Molecular cloning and DNA sequences of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1408-1412.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262 (5133): 539-544.
- Chang WW, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL, Roberts JK (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol* 122: 295-318.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133-1144.
- Chen W, Chao G, Singh KB (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J* 10: 955-966.
- Chen YF, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 19861-19866.
- Chen YF, Etheridge N, Schaller GE (2005) Ethylene signal transduction. *Annals of Botany* 95: 901-915.
- Cheong YH, Moon BC, Kim JK, Kim CY, Kim MC, Kim IH, Park CY, Kim JC, Park BO, Koo SC, Yoon HW, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Cho MJ (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol* 132: 1961-1972.
- Cheong JJ, Choi YD (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet* 19 (7): 409-413.
- Chevallet M, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A, Rabilloud T, Leize-Wagner E (2006) Improved mass spectrometry compatibility is afforded by ammoniacal silver staining. *Proteomics* 6: 2350-2354.

- Cohen E, Kende H (1987) In vivo 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in internodes of deepwater rice: enhancement by submergence and low oxygen levels. *Plant Physiol* 84: 282-286.
- Cox KH, Goldberg RB (1988) Analysis of plant gene expression. In: Shaw CH (ed), *Plant Molecular Biology: A Practical Approach*, pp1-35, IRL Press, Oxford.
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
- Dat JF, Capelli N, Folzer H, Bourgeade P, Badot PM (2004) Sensing and signalling during plant flooding. *Plant Physiol Biochem* 42: 273-282.
- Davis SJ, Kurepa J, Vierstra RD (1999) The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6541-6546.
- De Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES, Dolferus R (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 111: 381-391.
- DeLisle AJ, Ferl RJ (1990a) Transcriptional control of alcohol dehydrogenase genes in plants. *Int Rev Cytol* 123: 39-60.
- DeLisle AJ, Ferl RJ (1990b) Characterization of the *Arabidopsis* Adh G-box binding factor. *Plant Cell* 2:547-557.
- Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J Exp Bot* 51: 89-97.
- Dolferus R, Jacobs M (1984) Polymorphism of Alcohol Dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Genetical and Biochemical Characterization. *Biochemical Genetics* 9/10: 817-838.
- 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.
- Dordas C, Rivoal J, Hill RD (2003) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann Bot (Lond)* 91: 173-178.
- Drew MC, He CJ, Morgan PW (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 5: 123-127.

- Ecker JR (2004) Reentry of the ethylene MPK module. *Plant Cell* 16: 3169-3173.
- Ellis JG, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ (1987) Maize Adh-1 promoter sequences control anaerobic regulation: addition of upstream promoter elements from constitutive genes is necessary for expression in tobacco. *EMBO J* 6 (1): 11-16.
- Ellis MH, Dennis ES, Peacock WJ (1999) Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol* 119: 57-64.
- English PJ, Lycett GW, Roberts JA, Jackson MB (1995) Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. *Plant Physiol* 109: 1435-1440.
- Ferl RJ, Dlouhy SR, Schwartz D (1979) Analysis of maize alcohol dehydrogenase by native-SDS two dimensional electrophoresis and autoradiography. *Mol Gen Genet* 169: 7-12.
- Ferl RA, Laughner BH (1989) In vivo detection of regulatory factor binding sites of Arabidopsis thaliana Adh. *Plant Mol Biol* 12: 357-366.
- Fernandez-Maculet JC, Dong JG, Yang SF (1993) Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by carbon dioxide. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 1168-1173.
- Fischer HM (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* 58: 352-386.
- Fischer U, Dröge-Laser W (2004) Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 1162-1171.
- Fleet JC (1998) Identification of Nramp2 as an iron transport protein: another piece of the intestinal iron absorption puzzle. *Nutr Rev* 56: 88-89.
- Foley RC, Grossman C, Ellis JG, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ, Singh KB (1993) Isolation of a maize bZIP protein subfamily: candidates for the ocs-element transcription factor. *Plant J* 3: 669-679.
- Frangioni JV, Neel BG (1993) Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem* 210: 179-187.
- 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 (2004) Plant responses to hypoxia--is survival a balancing act? *Trends Plant Sci* 9: 449-456.
- 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.
- Gabrielsen OS, Sentenac A, Fromageot P (1991) Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix-related motif. *Science* 253: 1140-1143.
- Garcia V, Salanoubat M, Choisne N, Tissier A (2000) An ATM homologue from *Arabidopsis thaliana*: complete genomic organisation and expression analysis. *Nucleic Acids Res* 28: 1692-1699.
- Ge YZ, Pu MT, Gowher H, Wu HP, Ding JP, Jeltsch A, Xu GL (2004) Chromatin targeting of *de novo* DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem* 279: 25447-25454.
- Gechev TS, Minkov IN, Hille J (2005) Hydrogen peroxide-induced cell death in *Arabidopsis*: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. *IUBMB Life* 57: 181-188.
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20: 601-605.
- Gibbs J, Morrell S, Valdez A, Setter TL, Greenway H (2000) Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. *J Exp Bot* 51: 785-796.
- Gilles-Gonzalez MA, Ditta GS, Helinski DR (1991) A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350: 170-172.
- Gleave AP (1992) A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol Biol* 20: 1203-1207.
- Gong W, Hao B, Mansy SS, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, Chan MK (1998) Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15177-15182.
- Gonzali S, Loreti E, Novi G, Poggi A, Alpi A, Perata P (2005) The use of microarrays to study the anaerobic response in *Arabidopsis*. *Ann Bot (Lond)* 96: 661-668.

- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
- Grandbastien MA, Lucas H, Morel JB, Mhiri C, Vernhettes S, Casacuberta JM (1998) The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica* 100: 241-252.
- Grichko VP, Glick BR (2001) Ethylene and flooding in plants. *Plant Physiol and Biochem* 39: 1-9.
- Gunsalus RP, Park SJ (1994) Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res Microbiol* 145: 437-450.
- Guo H, Ecker JR (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115: 667-677.
- Hantula J, Lilja A, Nuorteva H, Parikka P und Werres, S (2000) Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycol Res* 104: 1062-1068.
- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A (1998) Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J Biol Chem* 273: 26857-26861.
- Hazes B (1996) The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Sci* 5: 1490-1501.
- He CJ, Morgan PW, Drew MC (1996) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiol* 112: 463-472.
- Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A, Ecker JR (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* 97: 383-393.
- Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ, Dennis ES (1998) Evidence for a role of AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* 149: 479-490.
- Hoffmann-Benning S, Kende H (1994) Cuticle biosynthesis in rapidly growing internodes of deepwater rice. *Plant Physiol* 104: 719-723.

- Hon T, Dodd A, Dirmeier R, Gorman N, Sinclair PR, Zhang L, Poyton RO (2003) A mechanism of oxygen sensing in yeast. Multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. *J Biol Chem* 278: 50771-50780.
- Hoving S, Gerrits B, Voshol H, Müller D, Roberts RC, van Oostrum J (2002) Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics* 2: 127-134.
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM (1995) Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. *Science* 269: 1712-1714.
- Hua J, Meyerowitz EM (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell* 94: 261-271.
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleecker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1321-1332.
- Huang S, Ishizawa K, Greenway H, Colmer TD (2005) Manipulation of ethanol production in anoxic rice coleoptiles by exogenous glucose determines rates of ion fluxes and provides estimates of energy requirements for cell maintenance during anoxia. *J Exp Bot* 56: 2453-2463.
- Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES (2002) Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 17197-17202.
- Igamberdiev AU, Baron K, Manac'h-Little N, Stoimenova M, Hill RD (2005) The haemoglobin/nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. *Ann Bot (Lond)* 96: 557-564.
- Ismond KP, Dolferus R, De Pauw M, Dennis ES, Good AG (2003) Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol* 132: 1292-1302.
- Iuchi S, Chepuri V, Fu HA, Gennis RB, Lin EC (1990) Requirement for terminal cytochromes in generation of the aerobic signal for the arc regulatory system in *Escherichia coli*: study utilizing deletions and lac fusions of cyo and cyd. *J Bacteriol* 172: 6020-6025.
- Jackson MB (1985) Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 145-174.
- Jackson MB (2008) Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. *Ann Bot (Lond)* 101: 229-248.

- Jensen ON (2004) Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 8: 33-41.
- Jervis AJ, Green J (2007) In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O₂ availability. *J Bacteriol* 189: 2930-2932.
- Jiao XZ, Yip WK, Yang SF (1987) The effect of light and phytochrome on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in etiolated wheat seedling leaves. *Plant Physiol* 85: 643-647.
- Jin LT, Hwang SY, Yoo GS, Choi JK (2006) A mass spectrometry compatible silver staining method for protein incorporating a new silver sensitizer in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis gels. *Proteomics* 6: 2334-2337.
- Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M, Okamura JK (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 6: 1211-1225.
- Jung J, Won SY, Suh SC, Kim H, Wing R, Jeong Y, Hwang I, Kim M (2007) The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in Arabidopsis. *Planta* 225: 575-588.
- Justin SHF, Armstrong W (1987) The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytol* 106: 465-495.
- Justin SHF, Armstrong W (1991) Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytol* 118: 49-62.
- Kane LA, Yung CK, Agnetti G, Neverova I, Van Eyk JE (2006) Optimization of paper bridge loading for 2-DE analysis in the basic pH region: application to the mitochondrial subproteome. *Proteomics* 6: 5683-7.
- Kao CH, Yang SF (1982) Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. *Planta* 155: 261-266.
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H (1998) Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204: 277-287.
- Kende H, van der Knaap E, Cho HT (1998) Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. *Plant Physiol* 118: 1105-1110.

- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.
- Kiley PJ, Beinert H (1998) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* 22: 341-352.
- Kiley PJ, Beinert H (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6: 181-185.
- Király L, Hafez YM, Fodor J, Király Z (2008) Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *J Gen Virol* 89: 799-808.
- 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.
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weisshaar B (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 263-276.
- Kwast KE, Burke PV, Poyton RO (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exp Biol* 201: 1177-1195.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)* 9: 963-967.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Liang X, Abel S, Keller JA, Shen NF, Theologis A (1992) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11046-11050.
- Liang X, Oono Y, Shen NF, Köhler C, Li K, Scolnik PA, Theologis A (1995) Characterization of two members (*ACS1* and *ACS3*) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 167: 17-24.

- Liesack W, Schnell S, Revsbech NP (2000). Microbiology of flooded rice paddies. FEMS Microbiol Rev 24: 625-645.
- Lin RC, Park HJ, Wang HY (2008) Role of Arabidopsis RAP2.4 in regulating light- and ethylene-mediated developmental processes and drought stress tolerance. Molecular Plant 1: 42-57.
- Liu F, VanToai T, Moy LP, Bock G, Linford LD, Quackenbush J (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxia response in Arabidopsis. Plant Physiol 137: 1115-1129.
- Liu D, Zhang X, Cheng Y, Takano T, Liu S (2006) rHsp90 gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Physiol Biochem 44: 380-386.
- Liu YV, Semenza GL (2007) RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization. Cell Cycle 6: 656-659.
- Logan DC, Domergue O, Teyssendier de la Serve B, Rossignol M (1997) A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development. Biochem Mol Biol Int 43: 1051-1062.
- Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF (2000) A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. Electrophoresis 21: 3673-3683.
- López JL (2007) Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 849: 190-202.
- Lottspeich F (1999) Proteomanalyse – ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. Angewandte Chemie 111: 2630-2647.
- Luche S, Diemer H, Tastet C, Chevallet M, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T (2004) About thiol derivatization and resolution of basic proteins in two-dimensional electrophoresis. Proteomics 4: 551-561.
- Mahmood T, Jan A, Kakishima M, Komatsu S (2006) Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. Proteomics 6: 6053-6065.
- Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. Nat Biotechnol 21: 255-261.

- Marouga R, David S, Hawkins E (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382: 669-678.
- Menke FL, van Pelt JA, Pieterse CM, Klessig DF (2004) Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 897-907.
- Mekhedov SI, Kende H (1996) Submergence enhances expression of a gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in deepwater rice. *Plant Cell Physiol* 37: 531-537.
- Mergemann H, Sauter M (2000) Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiol* 124: 609-614.
- Métraux JP, Kende H (1983) The role of ethylene in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol* 72: 441-446.
- Miller I, Crawford J, Gianazza E (2006) Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 6: 5385-408.
- Minden J (2007) Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. *Biotechniques* 43: 739-743.
- Mirica LM, Klinman JP (2008) The nature of O₂ activation by the ethylene-forming enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1814-1819.
- Miyazaki JH, Yang SF (1987) Metabolism of 5-methylthioribose to methionine. *Plant Physiol* 84: 277-281.
- Mujer CV, Rumpho ME, Lin JJ, Kennedy RA (1993) Constitutive and inducible aerobic and anaerobic stress proteins in the Echinochloa complex and rice. *Plant Physiol* 101 (1): 217-226.
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59 (3): 501-520.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18: 100-127.
- Mühlenbock P, Plaszczyca M, Plaszczyca M, Mellerowicz E, Karpinski S (2007) Lysigenous aerenchyma formation in Arabidopsis is controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell* 19: 3819-3830.

- 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.
- Nameki N, Tochio N, Koshiha S, Inoue M, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Fujikura Y, Saito M, Ikari M, Watanabe M, Terada T, Shirouzu M, Yoshida M, Hirota H, Tanaka A, Hayashizaki Y, Güntert P, Kigawa T, Yokoyama S (2008) Solution structure of the PWWP domain of the hepatoma-derived growth factor family. *Protein Sci* 14: 756-764.
- Ogawa T, Pan L, Kawai-Yamada M, Yu LH, 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 and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant Physiol* 138: 1436-1445.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173-82.
- Olmedo G, Guo H, Gregory BD, Nourizadeh SD, Aguilar-Henonin, Li H, An F, Guzman P, Ecker JR (2006) ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exonuclease required for regulation of the EIN3 targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13286-13293.
- Okamura JK, Caster B, Villarreal R, Van Montagu M, Jofuku KD (1997) The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7076-7081.
- Olsson I, Larsson K, Palmgren R, Bjellqvist B (2002) Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* 2: 1630-1632.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J* 22: 1282-1288.
- Peleman J, Boerjan W, Engler G, Seurinck J, Botterman J, Alliotte T, Van Montagu M, Inzé D (1989) Strong cellular preferences in the expression of a housekeeping gene of Arabidopsis thaliana encoding S-adenosylmethionine synthetase. *Plant Cell* 1: 81-93.
- Peng HP, Chan CS, Shih MC, Yang SF (2001) Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 742-749.
- Peng HP, Lin TY, Wang NN, Shih MC (2005) Differential expression of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis* during hypoxia. *Plant Mol Biol* 58: 15-25.
- Perata P, Voesenek LA (2007) Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci* 12: 43-46.

- Poneleit LS, Dilley DR (1993) Carbon dioxide activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase in ethylene biosynthesis. *Postharvest Biol and Technol* 3: 191-199.
- Raffaele S, Rivas S, Roby D (2006) An essential role for salicylic acid in AtMYB30-mediated control of the hypersensitive cell death program in Arabidopsis. *FEBS Lett* 580: 3498-3504.
- Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ (2006) A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11081-11085.
- Raskin I, Kende H (1984) Role of gibberellin in the growth response of submerged deep water rice. *Plant Physiol* 76: 947-950.
- Richert S, Luche S, Chevallet M, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T (2004) About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 4: 909-916.
- Riechmann JL, Meyerowitz EM (1998) The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* 379: 633-646.
- Rieu I, Cristescu SM, Harren FJ, Huibers W, Voeselek LA, Mariani C, Vriezen WH (2005) *RP-ACS1*, a flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of *Rumex palustris*, is involved in rhythmic ethylene production. *J Exp Bot* 56: 841-849.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3: 1154-1169.
- Russell DA, Wong DML, Sachs MM (1990) The anaerobic response of soybean. *Plant Physiol* 92: 401-407.
- Rutenber E, Ready M, Robertus JD (1987) Structure and evolution of ricin B chain. *Nature* 326: 624-626.
- Sachs MM, Freeling M, Okimoto R (1980) The anaerobic proteins of maize. *Cell* 20: 761-767.
- Sachs MM, Subbaiah CC, Saab IN (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J Exp Bot* 47: 1-15

- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2002) DNA binding specificity of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 998-1009.
- Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 (36): 22642-22647.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Sauter M, Kende H (1992) Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362-368.
- Sauter M (2000) Rice in deep water: "how to take heed against a sea of troubles". *Naturwissenschaften* 87: 289-303.
- Sato Y, Yokoya S (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep* 27: 329-334.
- Shen S, Matsubae M, Takao T, Tanaka N, Komatsu S (2002) A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. *J Biochem* 132: 613-620.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.
- Shigyo M, Hasebe M, Ito M (2006) Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene* 366: 256-265.
- Stec I, Nagl SB, van Ommen GJ, den Dunnen JT (2000) The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? *FEBS Lett* 473: 1-5.
- Steffens B, Sauter M (2005) Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiol* 139: 713-721.
- Steffens B, Wang J, Sauter M (2006) Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid regulate emergence and growth rate of adventitious roots in deepwater rice. *Planta* 223: 604-612.
- 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 USA* 94: 1035-1040.

- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol*: 447-456.
- Subbaiah CC, Zhang J, Sachs MM (1994) Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. *Plant Physiol* 105: 369-376.
- Sutter CH, Laughner E, Semenza GL (2000) Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4748-4753.
- Talamè V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R (2007) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *J Exp Bot* 58: 229-240.
- Tang W, Deng Z, Oses-Prieto JA, Suzuki N, Zhu S, Zhang X, Burlingame AL, Wang ZY (2008) Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Mol Cell Proteomics* 7: 728-738.
- Tatham AS, Hayes L, Shewry PR, Urry DW. Wheat seed proteins exhibit a complex mechanism of protein elasticity. *Biochim Biophys Acta* 1548: 187-193.
- Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven LJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, Tobin EM, Harren FJ, Millar AJ, Van Der Straeten D (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 3751-3761.
- Thomashow MF (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol* 125: 89-93.
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1: 377-396.
- Unlü M, Morgan ME, Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071-2077.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529-1539.
- Valvekens D, Montagu Van M, Lijsebettens Van M (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5536-5540.

- Van der Straeten D, Anuntalabhochai S, Van Caeneghem W, Zhou Z, Gielen J, Van Montagu M (1997) Expression of three members of the ACC synthase gene family in deepwater rice by submergence, wounding, and hormonal treatments. *Plant Sci* 124: 79-87.
- Van Der Straeten D, Zhou Z, Prinsen E, Van Onckelen HA, Van Montagu MC (2001) A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice. *Plant Physiol* 125: 955-968.
- Vergara BS, Jackson B, De Datta Sk (1976) Deep water rice and its response to seep water stress. In *Climate and Rice*, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, 301-319.
- Visser E, Cohen JD, Barendse G, Blom C, Voeselek L (1996) An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiol* 112: 1687-1692.
- Voeselek LA, Harren FJ, Bögemann GM, Blom CW, Reuss J (1990) Ethylene production and petiole growth in *Rumex* plants induced by soil waterlogging: The application of a continuous flow system and a laser driven intracavity photoacoustic detection system. *Plant Physiol* 94: 1071-1077.
- Voeselek L, Banga M, Thier RH, Mudde CM, Harren F, Barendse G, Blom C (1993) Submergence-induced ethylene synthesis, entrapment, and growth in two plant species with contrasting flooding resistances. *Plant Physiol* 103: 783-791.
- Voeselek L, Vriezen WH, Smekens M, Huitink F, Bogemann GM, Blom C (1997) Ethylene sensitivity and response sensor expression in petioles of *Rumex* species at low O₂ and high CO₂ concentrations. *Plant Physiol* 114: 1501-1509.
- Voeselek LA, Benschop JJ, Bou J, Cox MC, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RA, Peeters AJ (2003) Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Ann Bot (Lond)* 91: 205-211.
- Voeselek LA, Colmer TD, Pierik R, Millenaar FF, Peeters AJ (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytol* 170: 213-226.
- Vriezen WH, Hulzink R, Mariani C, Voeselek LA (1999) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity limits ethylene biosynthesis in *Rumex palustris* during submergence. *Plant Physiol* 121: 189-196.
- Wang SY, Adams DO, Lieberman M (1982) Recycling of 5'-methylthioadenosine-ribose carbon atoms into methionine in tomato tissue in relation to ethylene production. *Plant Physiol* 70: 117-121.

- Wang ET, Martínez-Romero E (2000) *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating Rhizobia in different environments. *Microb Ecol* 40: 25-32.
- Wang H, Huang Z, Chen Q, Zhang Z, Zhang H, Wu Y, Huang D, Huang R (2004) Ectopic overexpression of tomato *JERF3* in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol Biol* 55: 183-192.
- Wang NN, Shih MC, Li N (2005) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of Arabidopsis ACC synthase genes *AtACS4*, *AtACS5*, and *AtACS7* induced by hormones and stresses. *J Exp Bot* 56: 909-920.
- Warburg O, Christian W, Griese A (1935) Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. *Biochem Z* 282: 157-145.
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)* 100: 681-697.
- Weiss W, Görg A (2007) Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. *Methods Mol Biol* 355: 121-143.
- Welsch R, Medina J, Guiliano G, Beyer P, Von Lintig J (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 523-534.
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D, Beyer P (2007) Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: stable elements in the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 145: 1073-1085.
- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, Wiedmann M (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* 370: 434-440.
- Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B (2007) Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7:340-350.
- Wilson DW, Whiteheart SW, Wiedmann M, Brunner M, Rothmann JE (1992) A multisubunit particle implicated in membrane fusion. *J Cell Biol* 117: 531-538.
- 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.

- Yamagami T, Tsuchisaka A, Yamada K, Haddon WF, Harden LA, Theologis A (2003) Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *J Biol Chem* 278 (49): 49102-49112.
- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA, Sun WN (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol. Cell Proteomics* 5: 484-496.
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 155-189.
- Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, Brown D, Wu K (2005) Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Mol Biol* 58: 585-596.
- Yi SY, Kim JH, Joung YH, Lee S, Kim WT, Yu SH, Choi D (2004) The pepper transcription factor CaPF1 confers pathogen and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136: 2862-2874.
- Yoo JH, Park CY, Kim JC, Heo WD, Cheong MS, Park HC, Kim MC, Moon BC, Choi MS, Kang YH, Lee JH, Kim HS, Lee SM, Yoon HW, Lim CO, Yun DJ, Lee SY, Chung WS, Cho MJ (2005) Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in Arabidopsis. *J Biol Chem* 280: 3697-3706.
- Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* 451: 789-795.
- Zang X, Komatsu S (2007) A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry* 68: 426-437.
- Zarembinski TI, Theologis A (1997) Expression characteristics of *OS-ACS1* and *OS-ACS2*, two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L. cv. Habiganj Aman II) during partial submergence. *Plant Mol Biol* 33: 71-77.
- Zhang Z, Barlow JN, Baldwin JE, Schofield CJ (1997) Metal-catalyzed oxidation and mutagenesis studies on the iron(II) binding site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Biochemistry* 36: 15999-16007.
- Zhang L, Hach A (1999) Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell Mol Life Sci* 56: 415-426.
- Zhang H, Zhang D, Chen J, Yang Y, Huang Z, Huang D, Wang XC, Huang R (2004) Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Mol Biol* 55: 825-834.

Zhao X, Huang XR, Sun CC (2006) A molecular dynamics analysis of the GCC-box binding domain in ethylene-responsive element binding factors. *J Struct Biol* 156: 537-545.

Zhou Z, de Almeida Engler J, Rouan D, Michiels F, Van Montagu M, Van Der Straeten D (2002) Tissue localization of a submergence-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in rice. *Plant Physiol* 129: 72-84.

Zheng XM, Black D, Chambon P, Egly JM (1990) Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* 344: 556-559.

Zieske LR (2006) A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 57: 1501-1508.

8 Anhang

Anhang 1: Identifizierte Proteine aus Reis. Ergänzend zu Tabelle 3 sind Zugangsnummern (NCBI), Massen und pI-Werte der hypoxieregulierten Proteine dargestellt.

Nr.	Zugangsnummer	MW [Da]	pI	Score	Protein	putative Klassifizierung
1	gij38344345	51629,02	6,2	50,10	Retrotransposon protein, putative, Ty3-gypsy subclass	Sonstige
2	gij115467250	41752,29	5,08	549,00	Pro-resilin precursor, putative, expressed	Unbekannt
3	gij115467250	41752,29	5,08	549,00	Pro-resilin precursor, putative, expressed	Unbekannt
4	gij125549847	27914,97	6,8	51,50	Cyclin-dependent protein kinase, putative, expressed	Zellteilung
5	gij125557699	32222,84	4,39	40,00	PWWP domain containing protein, expressed	Unbekannt
6	gij125557699	32222,84	4,39	51,50	PWWP domain containing protein, expressed	Unbekannt
8	gij115450773	90429,00	5,12	128,00	Cell division control protein 48 homolog E, putative, expressed	Zellteilung
9	gij108864706	60186,58	5,02	102,00	Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed	Stressantwort
10	gij108864706	60186,58	5,02	49,30	Heat shock cognate 70 kDa protein, putative, expressed	Stressantwort
11	gij115440691	60980,02	5,42	192,00	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative, expressed	Glykolyse
13	gij115481260	48226,50	5,5	415,00	Enolase 2	Glykolyse
14	gij125570164	41660,08	5,97	248,00	S-adenosylmethionine synthetase 1, putative, expressed	Metabolismus, Sonstige
15	gij108706531	30009,00	5,26	80,00	40S ribosomal protein SA, putative, expressed	Proteinbiosynthese
16	gij115459078	36920,96	6,34	226,00	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3, putative, expressed	Glykolyse
17	gij108706531	30009,02	5,26	122,00	40S ribosomal protein SA, putative, expressed	Proteinbiosynthese
18	gij115459078	36920,96	6,34	226,00	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3, putative, expressed	Glykolyse
19	gij115475700	32750,22	5,04	24,90	Alpha-soluble NSF attachment protein, putative, expressed	Vesikeltransport, Sonstige
20	gij115444057	29896,81	5,37	156,00	Proteasome subunit alpha type 1, putative, expressed	Proteinabbau
21	gij115474285	27214,63	5,21	164,00	OsAPx2 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
22	gij115452337	27252,76	5,42	373,00	OsAPx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
23	gij115475700	32750,22	5,04	49,90	Alpha-soluble NSF attachment protein, putative, expressed	Vesikeltransport, Sonstige
24	gij115444057	29896,81	5,37	219,00	Proteasome subunit alpha type 1, putative, expressed	Proteinabbau
25	gij115474285	27214,63	5,21	210,00	OsAPx2 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
26	gij115452337	27252,76	5,42	495,00	OsAPx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
27	gij115479853	21392,45	9,62	208,00	60S ribosomal protein L9, putative, expressed	Proteinbiosynthese
28	gij108711192	17929,94	5,87	189,00	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2, putative, expressed	Proteinbiosynthese
29	gij115479853	21392,45	9,62	114,00	60S ribosomal protein L9, putative, expressed	Proteinbiosynthese
30	gij125525325	16595,73	4,04	89,80	Calmodulin, putative, expressed	Signalübertragung, Sonstige
31	gij125525325	16596,00	4,04	106,00	Calmodulin, putative, expressed	Signalübertragung, Sonstige
32	gij125525325	16595,73	4,04	119,00	Calmodulin, putative, expressed	Signalübertragung, Sonstige
33	gij125543916	110512,72	5,89	60,40	Villin-3, putative, expressed	Sonstige

Nr.	Zugangsnummer	MW [Da]	pI	Score	Protein	putative Klassifizierung
34	gij115447567	65158,76	6,03	260,00	Heat shock protein ST1, putative, expressed	Stressantwort
37	gij125556819	56890,13	6,47	369,00	Catalase isozyme B, putative, expressed	Stressantwort
38	gij125570164	41660,08	5,97	456,00	S-adenosylmethionine synthetase 1, putative, expressed	Metabolismus, Sonstige
39	gij115452789	39254	6,3	71,00	Ricin B-related lectin domain containing protein	Sonstige
40	gij115436780	35068		179,00	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor, putative, expressed	Photosynthese
41	gij115487636	33652,23	6,73	223,00	OsAPx6 - Stromal Ascorbate Peroxidase, expressed	Stressantwort
42	gij115445585	24033,51	4,73	185,00	DREPP2 protein, putative, expressed	Sonstige
44	gij115450217	24033,51	4,73	164,00	Transcription factor homolog BTF3-like protein	Proteinbiosynthese
45	gij115482580	17624,23	6,62	147,00	Transcription factor BTF3, putative, expressed	Proteinbiosynthese
46	gij115460282	17850,64	9,23	53,00	60S ribosomal protein L12, putative, expressed	Proteinbiosynthese
47	gij125559047	19566,77	5,97	64,50	Eukaryotic translation initiation factor 5A, putative, expressed	Proteinbiosynthese
48	gij115440691	60980	5,42	216,00	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative, expressed	Glykolyse
49	gij57283874	53330,63	6,23	89,50	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	Photosynthese
50	gij115481260	48226,50	5,5	240,00	Enolase 2	Glykolyse
51	gij3024122	43329,78	5,68	89,00	S-adenosylmethionine synthetase 2	Metabolismus, Sonstige
53	gij115460466	35216,46	5,73	140,00	Coproporphyrinogen III oxidase, chloroplast precursor, putative, expressed	Photosynthese
54	gij115459078	36920,96	6,34	143,00	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Glykolyse
55	gij115477683	27393,18	6,93	183,00	Proteasome subunit alpha type 7	Proteinabbau
56	gij115452337	27252,76	5,42	349,00	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (Cytosolic ascorbate peroxidase 1)	Stressantwort
57	gij115455471	17761,83	5,71	52,90	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 (eIF-5A) (eIF-4D)	Proteinbiosynthese
60	gij115467250	41752,29	5,08	65,30	Pro-resilin precursor, putative, expressed	Unbekannt
66	gij115450217	19195,90	5,26	80,60	Transcription factor homolog BTF3-like protein	Proteinbiosynthese
67	gij2662343	49589,76	9,09	76,70	EF-1 alpha	Proteinbiosynthese
69	gij115459078	36920,96	6,34	221,00	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Glykolyse
70	gij115488288	29862,96	9,81	35,10	40S ribosomal protein S3a (CYC07 protein)	Proteinbiosynthese
71	gij115452337	27252,76	5,42	409,00	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (Cytosolic ascorbate peroxidase 1)	Stressantwort
73	gij115459078	36920,96	6,34	66,40	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Glykolyse
74	gij115488288	29862,96	9,81	69,80	40S ribosomal protein S3a (CYC07 protein)	Proteinbiosynthese
75	gij115452337	27252,76	5,42	385,00	Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) (Cytosolic ascorbate peroxidase 1)	Stressantwort
76	gij2662343	49589,76	9,09	31,00	EF-1 alpha	Proteinbiosynthese
77	gij2662343	49589,76	9,09	61,60	EF-1 alpha	Proteinbiosynthese
79	gij3024122	43329,78	5,68	61,30	S-adenosylmethionine synthetase 2	Metabolismus, Sonstige
84	gij115473429	28682,68	10,66	80,10	Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
85	gij115446173	24928,28	10,41	69,90	Ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
86	gij115473429	28682,68	10,66	79,90	Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese

Nr.	Zugangsnummer	MW [Da]	pI	Score	Protein	putative Klassifizierung
87	gij115446173	24928,28	10,41	214,00	Ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
88	gij115436432	17039,74	10,29	74,40	60S ribosomal protein L23a (L25)	Proteinbiosynthese
90	gij115489150	28459,95	10,99	128,00	60S ribosomal protein L2 (Fragment)	Proteinbiosynthese
91	gij115457852	25027,35	10,41	215,00	40S ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
93	gij115436432	17039,74	10,29	50,90	60S ribosomal protein L23a (L25)	Proteinbiosynthese
94	gij115474859	13668,77	11,48	84,70	60S ribosomal protein L34	Proteinbiosynthese
97	gij115443689	29960,25	10,13	72,90	40S ribosomal protein S4	Proteinbiosynthese
98	gij115457852	25027,35	10,41	264,00	40S ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
99	gij125557447	44796,18	10,53	219,00	Hypothetical protein Osl_024215	Unbekannt
100	gij115443689	29960,25	10,13	56,30	40S ribosomal protein S4	Proteinbiosynthese
102	gij115447017	24243,25	10,11	113,00	Ribosomal protein L6 (Fragment)	Proteinbiosynthese
103	gij115453877	25589,67	9,55	88,60	40S ribosomal protein S3	Proteinbiosynthese
104	gij115452469	22226,03	9,79	136,00	Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
105	gij115452469	22226,03	9,79	88,60	Ribosomal protein s6 RPS6-2	Proteinbiosynthese
106	gij115474527	15980,96	10,72	88,60	40S ribosomal protein S13	Proteinbiosynthese
107	gij115474527	15980,96	10,72	76,90	40S ribosomal protein S13	Proteinbiosynthese
109	gij115470817	17338,33	10,74	37,30	40S ribosomal protein S18	Proteinbiosynthese
110	gij115470817	17338,33	10,74	35,00	40S ribosomal protein S18	Proteinbiosynthese
112	gij115446173	24928,28	10,41	117,00	Ribosomal protein S8	Proteinbiosynthese
114	gij115436432	17039,74	10,29	55,20	Os01g0348700	Proteinbiosynthese
116	gij125562553	14571,78	10,19	50,30	Hypothetical protein Osl_029233	Unbekannt
118	gij115452789	39253,94	6,3	242,00	Ricin B-related lectin domain containing protein	Sonstige
124	gij115453345	28269,42	10,65	62,10	40S ribosomal protein S6	Proteinbiosynthese
132	gij115452469	22226,03	9,79	107,00	40S ribosomal protein S7	Proteinbiosynthese

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zur Anpassung an Hypoxie in *Oryza sativa* (L.) und *Arabidopsis thaliana* (L.)“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Kiel, Mai 2008

Manuela Hinz

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst meiner Doktormutter, Prof. Dr. Margret Sauter, für das Vertrauen, dass sie mir mit der Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe als „Seiteneinsteigerin“ entgegengebracht und mir dadurch ermöglicht hat, diese Arbeit durchzuführen. Insbesondere danke ich in diesem Zusammenhang für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung des neunmonatigen Forschungsaufenthaltes am CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien. Gleichermassen danke ich vielmals für die konstruktive Kritik, die sehr gute Betreuung, die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und ebenfalls für die ideelle Förderung, die mich während der Promotion nicht nur fachlich, sondern auch persönlich sehr geprägt hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und die anregenden, fachlichen Diskussionen bedanken. Michael Motzkus danke ich für die Anleitung in die Proteinanalytik, für seine Hilfe bei Problemen jeglicher Art, und vor allem für die Durchführung der Proteinauftrennung über 2D-HPLC. Mein Dank gilt zudem Dr. Bianka Steffens, Dr. Guillaume Rzewuski, Dr. Anke Kutschmar, Dr. Renate Dahlke, Timo Staffel, Katharina Bürstenbinder, Nils Stührwohldt und Mathias Klode.

Dr. Christoph Gelhaus danke ich für die MALDI-TOF/TOF MS Messungen und seine fachliche Beratung und Hilfe.

Dr. Rudy Dolferus möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit an seinem Projekt mitzuarbeiten und die Unterstützung danken. Jane Edlington danke ich für ihre Einweisung in die Laborarbeit am CSIRO. Dr. Iain Wilson sei für die Fortführung der Versuche und die Kooperation gedankt. Mein Dank gilt auch Dr. Liz Dennis und Dr. Jim Peacock, die eine Verlängerung des Forschungsaufenthaltes durch eine finanzielle Unterstützung ermöglichten. Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern/innen am CSIRO für das hilfsbereite Entgegenkommen danken. Dem DAAD danke ich für die freundliche Gewährung des Kurzzeitstipendiums.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden/innen, die ich in der Zeit weitgehend vernachlässigt habe, die mir aber stets Verständnis entgegengebracht und mich ermutigt haben.

Ich danke vor allem meiner Familie und meinem Mann Ingo, die mich immer wieder ermuntert und mir mit Rat, und vor allem viel Geduld zur Seite gestanden haben.

Schließlich möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, aber nicht im Einzelnen genannt wurden.

Lebenslauf

Name	Manuela Christina Hinz (geb. Koldewey)
Geburtsdatum	12.05.1977
Geburtsort	Hannover
Nationalität	deutsch

seit 01.03.2006	Stipendiatin des Graduiertenkollegs 820 „Natürliche Antioxidantien – ihr Wirkungsspektrum in Pflanzen, Lebensmittel, Tier und Mensch“ an der Universität Kiel, Abteilung für Entwicklungsbiologie und Physiologie der Pflanzen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sauter
15.05.2005 – 28.02.2006	Forschungsaufenthalt am CSIRO (Australian Commonwealth Scientific and Research Organization) Plant Industry in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Dolferus in Canberra, Australien
01.10.2003 – 14.05.2005	Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sauter
01.09.2003 – 15.09.2003	Praktikum an der Universität Hannover, Institut für Angewandte Genetik und Pflanzenzüchtung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. P. Braun
01.07.2003 – 01.08.2003	Praktikum an der Universität Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sauter
03.04.2003	Erlangung des akademischen Grades einer Diplom-Agraringenieurin
12.09.2001 – 15.12.2001	Durchführung eines Teils der Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Resistenz gegen Feuerbrand (<i>Erwinia amylovora</i>) an nicht in der deutschen Feuerbrandverordnung deklarierten Pflanzen, wie z. B. Rose“ am HortResearch Ruakura in Hamilton, Neuseeland
01.02.2001 – 28.03.2001	Praktikum bei der Bayerischen Landesanstalt für Wein- und Gartenbau in Veitshöchheim
06.04.2000	Vordiplom
07.02.2000 – 14.04.2000	Praktikum bei der Gärtnerei Lobermeier in Hannover
15.02.1999 – 09.04.1999	Praktikum am Botanischen Schulgarten in Hannover
15.10.1997	Studienbeginn an der Universität Hannover im Diplomstudiengang Gartenbau
11.06.1997	Abitur am Gymnasium der Helene-Lange Schule in Hannover