

Vergleichende Genexpressionsanalyse
als Reaktion auf
abiotische Stressfaktoren
in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Assa Yeroslaviz
aus Tirat-Zvi, Israel

Düsseldorf, Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Umweltbedingte Stressfaktoren bei Pflanzen	5
1.2 Stresstoleranz und -anpassung	6
Kältestress	6
Hitze stress	7
Licht stress	7
Trocken stress	7
Salz stress	8
Chemischer/oxidativer Stress	8
UV-B Stress	8
1.3 Ziel der Arbeit	9
2 Materialien und Methoden	10
2.1 Pflanzenmaterialien und Anzucht	10
2.2 Chemikalien und Enzyme	10
2.3 Oligonukleotide	10
2.4 Puffer und Medien	11
2.5 Software Tools und Internet Ressourcen	11
2.5.1 Software Tools	11
2.5.2 Internet Ressourcen, Datenbanken und Tools	11
2.6 Geräte und Materialien	12
2.7 Die Applikation umweltbedingter Stressfaktoren bei <i>A. thaliana</i> Pflanzen	12
2.8 Nukleinsäure-Chemische Methoden	15
2.8.1 Vorbereitung der Proben	15
2.8.2 Isolierung der Gesamt-RNA	16
2.8.3 Photometrische Mengenbestimmung der Gesamt-RNA	16
2.8.4 cDNA-Synthese	16
2.8.5 In-Vitro Transkription (IVT)	17
2.8.6 Fragmentierung der cRNA	17
2.8.7 Hybridisierung der Proben	18
2.9 Oligonucleotide Microarrays	18
2.9.1 Vorbereitung der Chips	18

2.9.2	Waschen und Färben	19
2.9.3	Visualisierung	19
2.9.4	Auswertung und Interpretation der Daten	20
2.10	Qualitätsanalyse der technischen Daten	20
2.10.1	Die Refiner-Analyse	20
2.10.2	Die R-Software	22
2.11	Die Identifizierung der deregulierten Gene	22
2.11.1	Die Bestimmung statistisch signifikanter, differentiell regulierter Gene	22
2.12	Analyse der abiotischen Stressreaktion mittels Gensignaturen	24
2.13	Die Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen	26
2.14	Zeitreihenanalyse	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Vorversuche zur Etablierung des experimentellen Designs	28
3.1.1	Kältestress	29
3.1.2	Hitzestress	31
3.1.3	Lichtstress	31
3.1.4	Trockenstress	32
3.1.5	Salzstress	33
3.1.6	Die Induktion von oxidativem Stress mittels Paraquat	34
3.1.7	UV-B Stress	34
3.2	Die Qualitätsanalysen der technischen Daten	34
3.3	Die Analyse differentiell-regulierter Gene anhand Genexpressionsprofile	43
3.3.1	Die Reaktion der Pflanze auf Hitzestress	44
3.3.2	Stressinduktion durch Trockenheit	69
3.3.3	Die Analyse der pflanzlichen Reaktionen auf UV-B Stress	85
4	Diskussion	100
4.1	Methodische Überlegungen	100
4.1.1	Einheitliche Phänotypisierung	100
4.1.2	Microarray-basierte Analyse	100
4.1.3	Festlegung der Parameter - Vergleichbare Methodik	102
4.2	Analyse der Genexpressionsprofile als Reaktion auf abiotischen Stress	102
4.3	Die Reaktion der Pflanze auf erhöhte Temperaturen	108
4.4	Die Identifizierung neuer stressregulierender Gene unter trockenheitsbedingten Stressbedingungen	111
4.5	Regulation der UV-Stress-Stressantwort	115
5	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	125
	Danksagung	148

Abbildungsverzeichnis

2.1	Versuchsablauf	13
2.2	Molekulare Struktur vom Paraquat	14
2.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der gRNA	16
2.4	Das Fragmentierungsgel von biologischen Replikaten	17
2.5	B2-Oligos Grid	17
2.6	RNA-Aufarbeitung in Übersicht	19
2.7	Workflow der Refiner Analyse	21
2.8	Arbeitsablauf der Analyst Session	23
2.9	Schematischer Überblick des GSEA Algorithmus	25
3.1	Bestimmung der Stressbedingungen unter Hitze-, Kälte- und Lichtstress	30
3.2	Bestimmung der Trockenstressbedingungen	32
3.3	Gradient der Salzkonzentrationen für die phänotypische Analyse	33
3.4	Vorversuche der UV- und Paraquat-Stressfaktoren	35
3.5	MA-Plot vor und nach der RMA-Normalisierung eines UV-Experimentes nach 9h.	38
3.6	Log-log Plot Analyse	39
3.7	Kerndichteschätzer-Analyse der Expressionsintensitäten	40
3.8	3'-5' Verhältnis der Kontrollgene auf dem Chip	41
3.9	RNA Degradationskurve	42
3.10	Zusammenfassung der aus der Analyse entfernten Experimente	43
3.11	Deregulierte Gene aller Stressfaktoren	45
3.12	Das Expressionsverhalten der Hsf Gene unter Hitze	46
3.13	Hsf als Biomarker des Hitzestimulus	46
3.14	Veränderte Expression unter Hitzestress	51
3.15	Repression verschiedener Gene als Reaktion auf Hitzestress	51
3.16	Regulation des ROS-Netzwerkes unter Hitze	58
3.17	Einfluss der Hitze auf metabolische Prozesse der Photosynthese und den Calvinzyklus	59
3.18	Genexpressionsveränderungen des Stärkemetabolismus während Hitzestress	61
3.19	Regulation des Auxin-Signalweges durch Hitzestress	61
3.20	Spektral-Map Analyse der Hitzestressexperimente	64
3.21	Zeitabhängiges Expressionsverhalten von Biomarkern unter Hitze	65
3.22	Expression der Gene mit einem einheitlichen Expressionsverhalten unter Hitzestress	66
3.23	Markergene unter Trockenstressbehandlung	70
3.24	Transkriptionsfaktoren unter dem Trockenstresseinfluss	72
3.25	Expression der Hitzeschockfaktoren unter Trockenstress	73

3.26	ABA-abhängige Genexpression unter Trockenstress	75
3.27	Gene des Photosystems II unter Trockenstress	76
3.28	Osmotischer Schutz gegen Trockenheit	76
3.29	Stärkeabbau zum Schutz vor Energieverlust	76
3.30	Hauptkomponentenanalyse der Trockenstressanalyse	81
3.31	Das Expressionsverhalten von UV-Stress Biomarkern	87
3.32	Deregulation der Zinkfingergene unter UV-Stress	88
3.33	NAC-Transkriptionsfaktoren unter UV-Stress	88
3.34	Hitzeschockfaktoren unter UV-Stress	88
3.35	Deregulierte MYB-Gene unter UV-Stress	88
3.36	Regulation der Antennen- und Photosystem II-Gene unter UV-Stress	90
3.37	Die Expression seneszenzregulierender Gene unter UV-Stress	90
3.38	Veränderungen im Auxinmetabolismus als Reaktion auf UV-Stress	91
3.39	Zellwandmodifizierende Gene unter UV-Stressbedingungen	91
4.1	Korrelationskoeffizienten aller Experimente und Zeitpunkte	101
4.2	Die relativen Genexpressionsprofile der abiotischen Stressfaktoren	105
4.3	Der Vergleich verschiedener differentiell regulierter Genlisten unterschiedlicher Stressfaktoren.	107
4.4	Die Expressionsänderung der Trockenstress-deregulierten Gene	111
4.5	Differentielle Regulation des RD29A-Gens	112
4.6	Deregulierte Kinasen aufgrund des trockenheitsbedingten Stresses	113
4.7	Gemeinsame deregulierte Gene unter Hitze-, Trockenheits- und UV-B-Stressfaktoren	119

Tabellenverzeichnis

2.1	Spritzmischung	14
2.2	Die Bibliothek der GSEA-Analyse	24
3.1	Vorversuche zur Bestimmung der Stressbedingungen	29
3.2	Anzahl der Chips pro Stressfaktor und Zeitpunkt	36
3.3	Qualitätsanalyse mittels Affymetrix-Software	36
3.4	Die differentiell regulierten Gene in den verschiedenen Stressfaktoren	44
3.5	Hochregulierte Gene unter Hitzestress	47
3.6	Herabregulierte Gene unter Hitzestress	48
3.7	Angereicherte funktionelle Kategorien der deregulierten Gene unter Hitzestress	50
3.8	Transkriptionsfaktorbindestellen unter Hitzestress	52
3.9	Bindestellenanalyse der hochregulierten Gene unter Hitzestress	53
3.10	GO-Klassifizierung der hitzespezifischen Promotormotive	53
3.11	Bindestellenanalyse der herabregulierten Gene unter Hitzestress	56
3.12	GO-Klassifizierung der Gene in der Gruppe der herabregulierten hitzespezifischen Promotormotive	56
3.13	Veränderungen der pflanzlichen Stoffwechselwege aufgrund des Hitzestresses	63
3.14	Funktionelle Kategorien der deregulierten Gengruppen unter Hitzestress	65
3.15	Clusteranalyse transient exprimierter Gene unter Hitze	67
3.16	Genexpressionsprofile der aufeinander folgenden Zeitpunkte	68
3.17	Deregulierte Gene unter trockenheitsinduziertem Stress	71
3.18	Anreicherung biologischer Funktionen unter trockenheitsbedingtem Stress	74
3.19	Die Signalwege unter dem Einfluss von Wassermangel	77
3.20	Überrepräsentierte Transkriptionsfaktorenbindestellen unter Trockenstress	80
3.21	Das Vorkommen biologischer Funktionen unter Trockenstress	80
3.22	Zeitabhängige Expression der Gene mit steigender Expression unter Trockenstress	82
3.23	Transient exprimierte Gene unter Trockenstress	83
3.24	Expressionsveränderungen direkt benachbarter Zeitpunkte	84
3.25	Differentiell regulierte Gene unter UV-Stress	86
3.26	Veränderungen der metabolischen Prozesse unter UV-Stress	93
3.27	Die transiente Expression der differentiell regulierten Gene unter UV-Stress	96
3.28	Veränderungen in der Genregulation als Reaktion auf UV-Stress über die Zeit	97
3.29	Transkriptionsfaktorbindestellen unter UV-Stressbedingungen	98

Zusammenfassung

Pflanzen als sessile Organismen können extremen Umweltbedingungen wie dem Sonnenlicht, Trockenheit, oder Kälte nicht entgehen. Aus diesem Grund haben sie im Verlauf der Evolution unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um solche Stressfaktoren zu kompensieren. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte und trotz aufwendiger Analysen konnte noch nicht entscheidend festgelegt werden, ob die Reaktion auf verschiedene umweltbedingte Stressfaktoren allgemein für alle Faktoren oder eher stressspezifisch stattfindet.

Die Komplexität der Stressantwort zeigt, dass mehrere Mechanismen aktiviert bzw. reprimiert werden, wenn die Pflanze dem Stress ausgesetzt wird. Die Ähnlichkeiten im Expressionsverhalten (gleiche Signalübertragungswege) können trotz der Differenzen auf der Genebene zum Teil die Schwierigkeiten bei der Lösung dieses Problems erklären. Die Frage der stressspezifischen bzw. allgemeinen Eigenschaften der Stressreaktion auf abiotischen Stress wurde in dieser Arbeit auf der Ebene der Genexpression nachgegangen.

Hochdurchsatzmethoden wie die Microarray-Technologie wurden u.a. dafür entwickelt, eine größere Anzahl an Genen unter gleichen Grundbedingungen aber unterschiedlichen Konditionen gleichzeitig analysieren zu können. Obwohl frühere Experimente die Reaktion der Pflanze auf den Stress bereits untersucht haben, stellt diese Arbeit erstmalig ein Kompendium unterschiedlichen Stressfaktoren zur Verfügung, die unter den gleichen Wachstumsbedingungen herangezogen wurden und noch wichtiger, eine ähnliche Stressintensität aufgewiesen haben. Die Pflanzen wurden Hitze, Trockenheit, Kälte, Salz-, chemischem (oxidativem) Stress und UV-Licht ausgesetzt. Nach einer zweiwöchigen Wachstumsperiode wurden die Pflanzen dem Stress ausgesetzt und an unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und verarbeitet. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde synthetisiert, in-vitro-transkribiert, hybridisiert und auf die Microarrays aufgetragen. Anschließend wurden die Intensitäten der Arrays in Expressionswerte umgerechnet und die Daten analysiert. Die Datenanalyse sollte Aufschluss über die Reaktion der Pflanzen bei den verschiedenen Stressfaktoren geben.

Die Resultate in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass es keine eindeutige Aufteilung in stressspezifischer und allgemeiner Antwort gibt. Bei der Analyse auf der Genebene wurden verschiedene Gene identifiziert, deren differentielle Expression einem einzigen Stressfaktor zugeordnet werden konnte, andere dagegen wurden bei mehreren oder gar allen Faktoren dereguliert. Manche dieser Übereinstimmungen haben sogar die entgegengesetzte Expressionsrichtung gezeigt. Auf der kategorischen Ebene wurden mehrere Signalkaskaden, metabolische Funktionen sowie biologische Prozesse identifiziert, die bei den verschiedenen Stressfaktoren unterschiedlich reagieren. Während zum Beispiel die Akkumulation der ROS-Elemente bei fast allen Stressfaktoren erhöht wurde, wiesen die metabolischen Prozesse der Phytohormone ein differentielles zum Teil widersprüchliches Verhalten auf. In der Zeitreihenanalyse wurde die Reaktion einzelner Gene sowie vollständiger Signalkaskaden über aufeinander folgenden Zeitintervallen beobachtet. Mit Hilfe dieser Art der Analyse war es möglich, die Frage nach einer früheren bzw. späteren Stressantwort zu beantworten. Zusammen mit

der Transkriptionsfaktorbindestellen-Analyse (TFBS) konnte hier gezeigt werden, dass diese Aufteilung zwar existiert, zeigt aber keine eindeutige Trennung für alle Stressfaktoren bzw. Kaskaden. Die TFBS-Analyse konnte zum Beispiel eine deutliche Unterteilung zwischen einer früheren allgemeinen und einer späteren stressspezifischen Akkumulation von Bindestellen und Hitzestress feststellen. Unter Trockenheit dagegen wurde keine solche Unterteilung identifiziert.

Die sehr große Anzahl an nicht-annotierten Genen, die in dieser Arbeit dereguliert wurden, kann bei der Lösung dieser Fragestellungen vielleicht weiter hilfreich sein. Dies bedarf aber weiterer Experimente, um sowohl deren Rolle als auch deren Zusammenhänge bzw. Abhängigkeiten zu definieren.

Abstract

Plants as sessile organisms can't prevent facing extreme environmental conditions such as intense sunlight, drought, or cold. Plants have therefore presumably developed many diverse mechanisms to cope with such extreme life conditions. In the last 50 years, a lot of effort was put into solving the question of how plants respond to abiotic stress factors. Though on the phenotypic level similarities could be found, an explanation for the difficulties in understanding the complete metabolome lies in the multiplicity of signalling pathways which react to a single stress and the diversification of gene expression profiles in each of the stress factors. In this thesis the question of stress specificity versus global stress reaction to various stress factors was investigated on the level of gene expressions.

High-throughput methods such as the microarrays were designed solely for the purpose of parallel investigation of a great number of genes or proteins (such as a complete genome) under identical conditions. To my knowledge, this work represents the first compendium of stress reactions, under which several abiotic stress conditions with similar phenotypes were analyzed on the basis of similarities in stress intensity. During this analysis the plants were exposed to various stress conditions (heat, drought, UV-light, cold, salt, treatment with paraquat to simulate chemical stress and intense light stress) on variable time periods as well as at different concentrations. After a growth period of two weeks, the plants were harvested at multiple time points. The probes were then processed and the total-RNA was synthesized, in-vitro transcribed and hybridized onto the microarrays. After washing and staining the probes intensities were calculated and converted into expression values. These expression profiles should shed more light on the mechanisms behind plants response to different stress factors and give better clarity whether a strict differentiation exists between a global and a stress-specific reaction to certain stress factors.

The results of this work suggest no clear separation into stress-specific and global stress reactions. During the analysis, various genes were identified, whose differential expression depends on specific stress factors. Others have shown a deregulation in response to many or even all stress factors. Some genes show an opposite regulation in different stress responses, being down-regulated in some, and up-regulated in other abiotic factors. At the systems level, several signaling pathways, metabolic functions and biological processes showed differential behaviour during various stress factors. While the accumulation of ROS-elements was an unanimous response to almost all stresses, the metabolic processes of phytohormones displayed a more differential and partially contradictory behavior. In the time-series analysis, the response of individual genes as well as complete signaling pathways over successive time intervals was observed. With the help of this analysis, it was possible to search for the early and late response of plants to stress on a gene- and pathway level.

The identification of transcription factor binding sites showed a clear separation of binding sites in early and late periods of reactions to heat stress, while a definite global reaction of binding sites accumulated under drought. Based on our observation, we conclude that no definite time-dependent division of stress responses exists. Instead there is a mixture of stress-specific and global signaling

pathways and gene expression profiles. As a next step, I propose to investigate the function of the vast number of non-annotated genes with no known functions that were deregulated in one or more stress factors. This will lead to a better understanding of the intertwined processes induced as a reaction to stress.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Umweltbedingte Stressfaktoren bei Pflanzen

Pflanzen existieren bereits mehr als 700 Millionen Jahre. Im Laufe dieser Evolutionszeit mussten die Pflanzen sich immer wieder an wechselnde Umweltbedingungen anpassen. Weil die Pflanzen sessile Organismen sind, mussten sie ihre Stoffwechsel- und Entwicklungsmetabolismen flexibel und anpassungsfähig programmieren. Pflanzen besitzen die Fähigkeit, sich auf veränderte bis extreme Stressbedingungen einzustellen. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Experimente durchgeführt, um die Reaktionen der Pflanzen auf abiotische Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, Trockenheit, hohe Salzkonzentration, Lichtintensitäten sowie UV-Licht besser verstehen zu können. Mit Hilfe dieser Arbeit sind verschiedene neue Verhaltensmuster festgestellt worden. Auch wenn diese Mechanismen noch nicht komplett entschlüsselt wurden, ist es heutzutage eine allgemein akzeptierte Annahme, dass Pflanzen über Stressrezeptoren verfügen. Ob es nur einen einzigen Rezeptor gibt, der zwischen den verschiedenen Stressfaktoren unterscheiden kann oder verschiedene stressspezifische Rezeptoren existieren, war bisher unklar.

Der Grund für die Schwierigkeiten bei der Analyse dieses Problems ist die Annahme, dass Pflanzen auf zweierlei Weise auf Stress reagieren. Ein Teil der Stressantwort wird als allgemein klassifiziert, wenn deren Reaktion bei mehreren Faktoren sichtbar wird. Es wird angenommen, dass diese globale Antwort bzw. die Mechanismen, die in dieser Phase aktiviert werden, für alle abiotischen Stressfaktoren gelten. Es wurde bereits in mehreren unterschiedlichen Untersuchungen herausgefunden, dass Calcium als Sekundärmetabolit an der Regulation mehrerer stressbedingter Metabolismen teilnimmt. Ein weiterer Befund war die erhöhte Aktivität der reaktiven Sauerstoffelemente (ROS) in unterschiedlichen Konzentrationen bei mehreren abiotischen Stressfaktoren. ROS-Elemente sind für ihre doppelte Funktion bekannt. In kleineren Konzentrationen dienen sie als sekundäre Signalmoleküle bei der Regulation der Stressantwort und weiteren Mechanismen. Bei einer erhöhten Konzentration haben diese Moleküle einen negativen Einfluss auf die zelluläre Infrastruktur. Dies führt zu der Einleitung des programmierten Zelltodes und zu starken Gewebeschäden. Darüber hinaus kontrollieren die ROS-Elemente mehrere Mechanismen von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen bis hin zum Schutz vor biotischen und abiotischen Reizen. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird, verhalten sie sich nicht immer konstant und können teilweise auch stressspezifisch wirken.

Alle pflanzlichen Mechanismen weisen gewisse Biomarker auf. Dabei handelt es sich um Gene, die meistens eine Schlüsselposition im oberen Level der verschiedenen Signalkaskaden besitzen. Diese Gene gehören meistens zu einer von drei Kategorien, Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen. Die Funktion der Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Stresssituationen wurde bereits in

früheren Experimenten gezeigt (u.a. [266, 274, 265, 322, 117, 20, 159, 290]). Diese Transkriptionsfaktoren werden beim Einwirken von unterschiedlichen Stressfaktoren aktiv. Die Tatsache, dass auf diesen Stress in unterschiedlicher Weise reagiert und dabei auch verschiedene Signalübertragungswege dereguliert werden, deutet darauf hin, dass diese Schlüsselgene zum Teil eine globale, aber zum Teil auch eine stressspezifische Reaktion steuern können. Frühere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass beim Vergleich der verschiedenen Stressfaktoren eine gemeinsame Gruppe deregulierter Gene aktiviert wurde [161, 280, 348, 361, 288]. Diese Beobachtung verstärkt die Annahme, dass ein gemeinsames Genset für die Signalübertragung mehrerer Stressfaktoren existiert. Die Komplexität der Stressfaktoren und deren Reaktionseigenheit lässt sich jedoch deutlich anhand der Differenzen sowohl in der Anzahl der Gene als auch anhand der unterschiedlichen veränderten Signalübertragungswege sowie der Periodizität der Expressionsprofile erkennen.

Die Hypothese über die Existenz mehrerer primärer Stressrezeptoren wird dadurch bestätigt [348]. Dagegen konnte gezeigt werden, dass Sekundärmetaboliten, wie ROS-Elemente, Calcium-Ionen oder Phytohormone eine Reihe unterschiedlicher Signalübertragungswege auf unterschiedliche Weise aktivieren. Die sekundär aktivierten Prozesse unterscheiden sich von der primären Reaktion sowohl zeitlich als auch vermutlich räumlich. Diese Sekundärantwort kann auch eine andere Spezifität aufweisen.

1.2 Stresstoleranz und -anpassung

Ein Stress kommt selten allein. Wenn der Boden trocken ist, steigt auch der Salzgehalt in der Erde. Weil Pflanzen wenige Möglichkeiten haben, Stress zu umgehen, müssen sie ausreichende Strategien entwickeln, um sich den wechselhaften umweltbedingten Situationen anzupassen. Obwohl die Pflanzen eine sehr wichtige Rolle im Leben auf der Erde spielen, ist trotzdem nur wenig darüber bekannt, wie sie sich den wechselnden Lichtverhältnissen bzw. den plötzlichen Klimaveränderungen anpassen, welche die Stressreaktionen hervorrufen [18]. In dieser Arbeit sollte ein Stresskompendium erstellt werden, in dem die Reaktionen auf verschiedene abiotische Stressfaktoren miteinander verglichen und explizit auf die weiteren Analysen angeschlossen werden können. Für diese umfangreiche Analyse wurden unterschiedliche Faktoren mit einer großen Auswirkung auf das Ertragsvolumen bzw. die Ertragsstabilität der Nutzpflanzen ausgewählt. Diese Stressfaktoren werden in der näheren Zukunft aufgrund der globalen klimatischen Veränderungen an Bedeutung gewinnen. Um die Agrarwirtschaft auf diesen Wechsel vorzubereiten, müssen weitere Erkenntnisse über die pflanzlichen Wechselwirkungen als Reaktion zum Beginn und während der Stressperiode erlangt werden. Aus diesem Grund wurden die folgenden Stressfaktoren für diese Analyse ausgesucht:

Kältestress

Kältestress stellt einen bedeutenden abiotischen Stressfaktor dar. Die Effekte der Kältebedingungen auf die Pflanze hängen vom Entwicklungsstadium, von der Stressintensität sowie von der Stressdauer ab [309]. Während eine schwache Kältephase lediglich die Akklimatisierungsprozesse der Pflanze startet, wird diese durch eine intensive Kälteperiode veranlasst, Wasser durch Osmose nach außen zu verlieren. Dies führt zu einer erhöhten Konzentration gelöster Stoffe in der Zelle und zu osmotischem Stress. Viele Nutzpflanzen (wie z.B. Weizen, Gerste, Roggen) benötigen sogar eine Kälteperiode für die Vernalisation, bevor sie überhaupt keimen können. Trotz dieser Voraussetzung beginnt die Pflanze ihre Akklimatisierungsfähigkeit im Anschluss an die vegetative Phase zu verlieren [76]. Andere

Pflanzen sind bereits von Beginn an kälte-sensitiv und besitzen gar kein Akklimatisierungspotenzial (u.a. Reis, Tomate, Baumwolle). Frühere Studien über Kälte- bzw. Frosttoleranz haben zu weiteren Erkenntnissen in diesem Bereich beigetragen. Beim Akklimatisierungsprozess werden zelluläre sowie Gewebestrukturen reorganisiert und umstrukturiert. Dabei spielen verschiedene Mechanismen verbunden mit veränderten Genexpressionsprofilen eine wichtige Rolle [313, 329].

Hitzestress

Hitzestress beeinflusst das Erntevolumen sehr stark [36, 39, 43, 163, 244]. Er führt zu Störungen im zellulären Gleichgewicht sowie zur Verzögerung im Wachstum und in der Entwicklung der Pflanze [232]. Die Anwesenheit von über 20 Hitzeschockfaktoren (HSFs) im *Arabidopsis*-Genom zeigt die Bedeutung dieses Stresses für die Pflanze sowie die Komplexität ihrer Antwort [36, 39]. Ähnlich wie beim Kältestress wird eine schwache Hitzeperiode Pflanzen veranlassen, eine Abwehrreaktion gegen diesen Stress zu entwickeln. Dies ist nötig, um die intensiven Veränderungen zu überstehen, welche die Hitzestress ausgesetzten Pflanze durchläuft. Hitze führt zu einer sehr komplexen Auswirkung auf die Pflanze, was durch die aufwendige Umstrukturierung der zellulären Metabolismen deutlich wird. Die Akkumulation mehrerer Hitzestressfaktoren (HSFs) signalisiert die komplexe Antwort der Pflanze auf den Stress.

Lichtstress

Eine plötzliche Erhöhung der Lichtintensität führt in der Pflanze zu einer Umstellung der metabolischen und physiologischen Prozesse. Dabei spielen die Erhöhung der ROS-Konzentrationen, die Anpassung der photosynthetischen Prozesse und die Vergrößerung des Vorrats an antioxidativen Metaboliten eine große Rolle beim Schutz der Pflanze gegen diesen Stress. Die Photosynthese ist der einzigartige Prozess für die Energiegewinnung in Pflanzen. Wird die Pflanze einer starken Lichtquelle ausgesetzt, dann wird in der Pflanze ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffelementen produziert, die durch die Anregung der Photosysteme und dem „Auslaufen“ der Elektronen aus dem Elektronentransportsystem akkumuliert werden [12, 153]. Die sekundären Effekte der ROS-Akkumulation belaufen sich auf die Synthetisierung von ROS-Abbaukomponenten (Peroxidasen, Katalasen usw.), der Produktion antioxidativer Metabolite (z.B. Anthocyane) zum Schutz gegen das Licht oder den Abbau des Photosyntheseapparates (z.B. Antennenpigmente oder Lichtkomplexe), um die Schäden zu begrenzen. Trotz mehrerer Untersuchungen blieben bisher viele Schritte in der sogenannten „systemic acquired acclimation“ (systemisch angeeignete Akklimatisierung, SAA) unklar [258].

Trockenstress

Wasserstress kann unter anderem durch Trockenheit induziert werden. Die Veränderungen des Wasserpotenzials im Boden rufen einen zusätzlichen osmotischen Stress hervor und bringen die ionische Homoöstatik aus dem Gleichgewicht. In der physiologischen Reaktion der Pflanze auf Trockenheit werden mehrere zelluläre Prozesse aktiviert. Einer der Effekte des trockenheitsinduzierten Stresses ist die Verminderung der Wachstumsrate [182, 38]. Die Einschränkungen im Wasserhaushalt haben immense Konsequenzen auf die Ernteproduktivität. Als Reaktion auf Trockenheit werden mehrere photochemische sowie physiologische Metabolismen geändert. Aufgrund der Reduktion der Wasserkonzentration wird die CO₂-Fixierung behindert, Osmolyten sowie kompatible Soluten werden akkumuliert und der osmotische Stress wächst. Obwohl man die Effekte des Stresses gut definieren kann,

sind die genauen Mechanismen, mit dem sich die Pflanze gegen Trockenheit schützen, noch nicht vollständig geklärt. Da man davon ausgehen kann, dass die meisten Veränderungen auf der Genebene stattfinden, wird durch weitere Experimente die Vervollständigung des Stressbildes angestrebt.

Salzstress

Die immer größer werdende Weltbevölkerung und intensivere Agrarwirtschaft in Kombination mit dem veränderten Klima führen zum zunehmenden Salzstress in der Erde. Die Versalzung der Erdoberfläche ist ein weit verbreitetes Problem der Agrarwirtschaft. Über 20% des Ackerlandes leiden unter zu hohen Salzkonzentrationen. Der wachsende Bedarf an Nahrungsmitteln verlangt Nutzpflanzen mit einer verbesserten Salztoleranz. Große Mengen von Salzionen führen zu einer toxischen Wirkung auf die Pflanze [180]. Sie können die enzymatische Aktivität in der Zelle hemmen. Salzstress ruft eine komplexe Reaktion von physiologischen Prozessen und einem veränderten Genexpressionsverhalten hervor [313, 286, 80, 350, 287]. In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte in der Analyse der Stressreaktion auf Salzstress erreicht (z.B. die Beteiligung der Ca^{2+} -Signale [179], die Aktivierung der SOS-Signalübertragungswege [97] oder die Ähnlichkeiten zu weiteren Stressfaktoren in der Gruppe der osmotischen Stresssituationen wie Kälte oder Trockenheit). Als Reaktion auf den Stress wird ein komplexes regulatorisches Netzwerk aktiviert, das die Genexpressionsmechanismen kontrolliert. Dabei werden Proteinmodifikationen und genetische oder epigenetische und transkriptionelle Veränderungen hervorgerufen.

Chemischer/oxidativer Stress

Der oxidative Stress wird durch die Freisetzung radikaler Elemente (ROS) in der Zelle hervorgerufen. Diese Sauerstoffderivate sind natürliche Nebenprodukte der Redox-Reaktionen in der Zelle. In niedrigen Konzentrationen dienen die ROS-Elemente sogar als Signalbotenstoffe bei der Regulierung verschiedener Mechanismen. Die erhöhte Produktion toxischer Elemente ist ein gemeinsamer Faktor bei der pflanzlichen Reaktion auf verschiedene biotische Stressfaktoren. Die Pflanzen haben im Verlauf der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um diese Schwankungen in der Radikalkonzentration zu regulieren. Der antioxidative Stoffwechselweg besteht aus einer großen Menge verschiedener Moleküle und Enzyme z.B. der Produktion von Anthocyanen, Ascorbaten oder Peroxidasen. Die Effekte der ROS-Akkumulation sind umfangreich. Einige davon sind Zellmembranabbrüche, Störungen in verschiedenen Signalübertragungswegen, Lipidperoxidation oder die Veresterung der Fettsäuren. Transkriptomanalysen der durch Paraquat behandelten Pflanzen können Aufschluss über die Pflanzenreaktion während eines oxidativen Stresses geben.

UV-B Stress

Pflanzen können sich ohne das Sonnenlicht nicht entwickeln, da sie die lichtbetriebene Photosynthese als Energiequelle zwingend benötigen. Das Sonnenlicht enthält UV-Strahlung. Dieses Beiprodukt stellt eine potenzielle Gefahr für die Pflanze dar. Durch die Erosion der Ozonschicht in verschiedenen Bereichen der Atmosphäre wird die Gefahr des UV-Stresses in der näheren Zukunft in einigen Teilen der Erde weiter wachsen. Die Effekte des UV-Lichts auf Pflanzen und diverse Organismen wurden bereits in der Literatur diskutiert [190, 201, 149, 321, 351]. Dabei zeigt sich, dass Stärke und Dauer der Stressbehandlung eine immense Bedeutung bei der Stressreaktion haben. Unter starker UV-Bestrahlung kann es in der Pflanze zu starken Gewebeschäden (Nekrosis) kommen. Darauf

reagiert die Pflanze mit der Aktivierung verschiedener Gene der Pathogenabwehr [321, 149] Pflanzen mit einer Störung in den UV-Schutzmechanismen (Flavonoide, Sinapinsäure-Esterverbindungen) weisen eine hohe Sensitivität gegenüber dem Stress auf [172, 166]. Trotz der immensen Wichtigkeit der UV-Stressreaktion wurden die dieser zugrunde liegenden Prozesse und Stoffwechselwege bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. So konnte z.B. der Stressrezeptor noch nicht identifiziert werden. Es wurde auch bereits bewiesen, dass sich diese Antwort von den normalen DNA-Reparaturmechanismen unterscheidet [41, 78].

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein erstes Kompendium mehrerer Stressfaktoren unter identischen Stressbedingungen zu erstellen. Die Analyse mehrerer Stressfaktoren wurde getrennt vorgenommen, um die Effekte des Stresses auf das Genexpressionsverhalten einzelner Stressfaktoren sowie zusammenhängender Stresseffekte zu identifizieren. Das Neue im experimentellen Design dieser Arbeit ist die Systematik mit der die Grundbedingungen der unterschiedlichen Stressfaktoren aneinander angepasst wurden, um einen einheitlichen Stresslevel zu erreichen. Dieser globale Transkriptions- bzw. Translationsvergleich mehrerer Faktoren unter langanhaltenden Stressbedingungen wurde bisher noch nicht durchgeführt. Diese Arbeit soll eine fundierte Basis für weitere spezifische Analysen bilden, um auf verschiedene stressbezogene Fragestellungen antworten zu können. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie die Stressreaktion einzelner Stressfaktoren verläuft. Es wird hier der Hypothese nachgegangen, dass die Stressantwort in eine allgemeine (frühere/primäre) Phase und eine stressspezifische (sekundäre/spätere) Phase unterteilt werden kann. Mit Hilfe dieses Kompendiums sollen weitere Analysen ermöglicht werden, um sich auf interessantere spezifischere Gengruppen oder Pathways zu konzentrieren, deren Verhalten unter einem bestimmten Stressfaktor verändert wurde. Es soll versucht werden, spezifische Gene zu identifizieren, die für einen einzigen Stress oder für eine Stresskombination interessant sein können. Hierdurch kann bei weiteren Analysen die Durchführung einer globalen Expressionsanalyse eingespart und der Fokus auf eine kleinere genauere Anzahl signifikanter Gene gelegt werden.

2.4 Puffer und Medien

Für die Kultivierung der *Arabidopsis* Sprösslinge wurde das folgende Wachstumsmedium verwendet:

MS Medium [220] Je 5% MS Micro- und Macrosolutions, 1.7% Glucose 0.05% MES
Mit 5M KOH auf pH-Wert 5.8. 0.5% Agar

Bei der Aufbereitung der Proben zur Isolierung der Gesamt-RNA, cDNA-Synthese und cRNA-Transkription (In-Vitro, IVT) wurden die folgenden Lösungen benutzt:

TAE Puffer	Tris, Acetat (Essigsäure), 0.5M Na ₂ EDTA
TE Puffer	Tris (pH 8.0), 0.5M Na ₂ EDTA
Erststrangsynthese Lösung	5x first strand buffer, 0.1M DTT, 10mM dNTPs
Zweitstrangsynthese Lösung	5x second strand buffer, DNA-Polymerase I, 10mM dNTPs, DNA-Ligase, RNaseH
Fragmentierungspuffer	1M Tris acetate (pH 8.1), MgOAc, KOAc
Hybridisierungscocktail	Control Oligo B2 3nM, 20x Control cRNA Cocktail, Herings Sperma (19mg/ml), acetyliertes BSA (50mg/ml), 2x MES Hybridisierungspuffer

Für die Vorbereitung, Hybridisierung und Aufarbeitung der Microarrays wurden die folgende Lösungen genommen:

Hybridisierungspuffer	12x MES Stock buffer, 5M NaCl, 0.5M EDTA, 10% Tween 20
Waschpuffer A	20x SSPE, 10% Tween 20
Waschpuffer B	12x MES Stock buffer, 5M NaCl, 10% Tween 20
Färbelösung 1,3	2x Stain buffer, BSA (50mg/ml), SAPE (1mg/ml)
Färbelösung 2	2x Stain buffer, BSA (50mg/ml), Goat IGG, Antistreptavidin (biotinylated)
Stain Buffer	12x MES Stock buffer, 5M NaCl, 10% Tween 20
12x MES Stock buffer	MES free acid monohydrate, MES sodium salt

2.5 Software Tools und Internet Ressourcen

2.5.1 Software Tools

Außer den üblichen Software für die Bild- und Textbearbeitung (Microsoft Office, Photoshop, Textpad usw.) wurden die folgenden speziellen Applikationen für die Arbeit verwendet:

<i>GeneChip</i> [®] Operating System Refiner Ver. 5.0	Affymetrix	Bedingungsprogramm für die Waschstation der Chips
Analyst Ver. 5.3	GeneData	Statistische Analysen und Preprozessierung der DNA Microarrays
R Software Paket Ver 2.9	GeneData	Auswertung der Daten aus Microarray Experimenten
GSEA	R Statistical Computing	Applikationsplattform für statistische Methoden zur Analyse von DNA Microarrays
Scifinder 2007	broad Institute	Applikation zur Analyse statistischer Signifikanz anhand von Gensignaturen
Spotfire	cas	Literatursuche in mehreren naturwissenschaftlichen Datenbanken
Pathway Studio 7	Tibco	Visualisierungsprogramm für statistische Resultate
	Ariadne genomics	Erstellung, Interpretation und Darstellung von Genexpressionsprofilen und Stoffwechselwegen. Suche nach Beziehungen zwischen Genen, Proteinen oder funktionelle Gruppen.

2.5.2 Internet Ressourcen, Datenbanken und Tools

Das Internet als Informationsquelle spielt eine besonders wichtige Rolle bei der Beschaffung von Informationen. Die nachfolgenden Webseiten wurden besonders häufig benutzt und trugen viel zur Vervollständigung der Information in dieser Arbeit bei:

http://www.arabidopsis.org/index.jsp	The Arabidopsis Information Resource Homepage
http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/	Arabidopsis Gene Regulatory Information Server
http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi	Gene Ontology Datenbank
http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp	Datenbank zur Visualisierung funktioneller Annotationen
http://datf.cbi.pku.edu.cn/	Information über <i>Arabidopsis</i> Transkriptionsfaktoren
http://pfam.sanger.ac.uk/	Proteinfamilien Datenbank
http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/	Annotationen der Affymetrix Proben
http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/info.html	Datenbank für cis-wirkende regulatorische DNA Elemente
http://www.ebi.ac.uk/GOA/	Gene Ontology Annotationen
http://www.genome.jp/kegg/	Datenbank für genomischen, molekularbiologischen und Netzwerk-basierten Information, Literaturrecherche
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Datenbank für molekularbiologischen Information
http://www.r-project.org/	Software für statistischen Analysen
http://www.bioconductor.org/	Softwareplattform für statistische Methoden zur Genomeanalyse
http://www.scopus.com/	Datenbank für Literaturrecherchen

2.6 Geräte und Materialien

Geräte		Materialien	
Biophotometer	Eppendorf	Adapterrack	Retsch
Celcam b/w	phase GmbH	Microarrays	Affymetrix
Centrifuge 5415 R / D	Eppendorf	Micropore	3M
Cryscopic Osmometer Osmomat 030	Gonotec	PE-Röhrchen	Sarstedt
Feinwaage	Sartorius	Petrischalen	Greiner
Fluidics Station 400	Affymetrix	Phase-Lock Gel heavy	Eppendorf
GeneChip Hybridization Oven 640	Affymetrix	Pipette	Rainin
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix	Pippetenspitzen	Rainin
Inkubationsschrank OV3	Biometra	Röhrchen	Sarstedt
Sterilbank LaminAir HA 2448	Hereaus	Uvetten	Eppendorf
LI 1000 DataLogger	Li-Cor Biosciences	UV-Leuchtröhren	Philips
PowerShot A640	Canon	Wolframcrbide Kügelchen	Qiagen
Retscher MM 301	Retsch		
Stratalinker 2400	Stratagene		
Thermocycler T3	Biometra		
Thermomixer compact	Eppendorf		
Ultra Thurrax RZR-2000	Heidolph		
UV-Entkeimungs-strahler NN30/82	Hereaus		
Uvikon Spectrophotometer 930	Kontron instruments		
Versatile environmental test chamber MLR-350HT	Sanyo		

2.7 Die Applikation umweltbedingter Stressfaktoren bei *A. thaliana* Pflanzen

Die zugrunde liegende Hypothese in dieser Arbeit war, dass Pflanzen auf jede Art des umweltbedingten Stresses in ähnlicher Weise reagieren. Um diese abiotischen Stressfaktoren vergleichen zu können, war es von höchster Wichtigkeit, dass die phänotypische Antwort auf jeden Stress möglichst identisch verläuft.

Aus diesem Grund wurden für alle Stressfaktoren erst mehrere Vorversuche durchgeführt. Es sollte vermieden werden, dass die Stressbedingungen dazu führen, dass die Pflanzen zu schnell absterben, ohne dass der Stress gemessen werden kann oder dass die Intensität des Stresses zu schwach ist, um eine Reaktion hervorzurufen. Nach Beendigung der Analyse der Vorversuche konnten die experimentellen Bedingungen in Erwartung einer ähnlichen Reaktion bei allen Stressfaktoren (SF) festgelegt werden.

Am Tag des Stressbeginns wurden die Platten den jeweiligen Stressbedingungen ausgesetzt (Abb. 2.1). Bei Stressfaktoren unter einem kontinuierlichen Stress (Hitze, Kälte, Salzstress, Lichtstress, che-

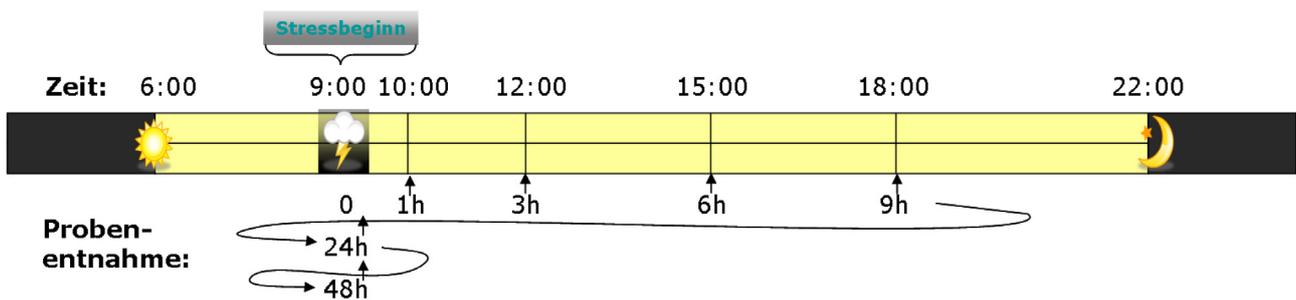


Abbildung 2.1: Versuchsablauf. Der feste Zeitpunkt für die Entnahme der Proben wurde gesetzt, um circadianische Fluktuationen in der pflanzlichen Reaktion zu vermeiden. Um sicherzustellen, dass alle Stressfaktoren miteinander vergleichbar sind, wurde darauf geachtet, dass eine bestimmte Uhrzeit für den Beginn aller Stressbehandlungen so wie einheitliche Zeitpunkte für die Probenentnahme bei allen Experimenten eingehalten wurden.

mischer Stress - Paraquat, Trockenstress - PEG 8000) wurden die Pflanzen diesem Stress ausgesetzt und bis zum Zeitpunkt der Ernte unter den Stressbedingungen gelagert. Bei dem transienten Stressfaktor (UV-Licht) wurden die Pflanzen dem Stress für die festgelegte Zeitperiode ausgesetzt und anschließend in der Klimakammer gelagert. Alle Stressversuche wurden gezielt um 09:00 Uhr gestartet, um mögliche circadianische Fluktuationen kontrollieren zu können. Zu bestimmten Zeitpunkten (1, 3, 6, 9, 24 und 48 Stunden nach Stressbeginn) wurden die Rosetten der behandelten Pflanzen und der Kontrollpflanzen in Eppendorf-Gefäßen (mit Schraubverschluss, SARSTEDT) geerntet (Abb. 2.1). Um zu vermeiden, dass die Pflanzen einem zusätzlichen Stress durch das Ernten ausgesetzt wurden, achtete man darauf, dass bei der Prozedur vom Beginn der Ernte bis zum Einfrieren der Probe der Zeitraum von 1min nicht überschritten wurde.

Kältestress. Die Pflanzen wurden unterschiedlich niedrigen Temperaturen (0°C, 2°C, 5°C und 10°C) für verschiedene Zeitperioden ausgesetzt. Die Zeit des Aussetzens variierte von drei Stunden bis zu fünf Tagen. Die Petrischalen wurden aus der Klimakammer genommen und in einem Klimaschrank (Versatile environmental test chamber MLR-350HT, SANYO) gelagert. Die Temperatur wurde eingestellt. Die Lichtintensität wurde bei 30-40µE (Mikrostein) gemessen. Die Feuchtigkeit im Klimaschrank lag bei ca. 70-80%. Als die Analyse der Vorversuche abgeschlossen war, wurde eine Temperatur von 5°C für das eigentliche Experiment festgelegt.

Hitzestress. In den experimentellen Vorversuchen zur Festlegung der experimentellen Bedingungen bei Hitzestress wurden die Pflanzen verschiedenen höheren Temperaturen (48°C, 45°C, 38°C und 35°C) für Zeitperioden von drei Stunden bis zu einer Woche ausgesetzt. Der experimentelle Verlauf ähnelt dem für die Applikation vom Kältestress. Mit Ausnahme der Temperatur wurden identische Bedingungen im selben Klimaschrank verwendet. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten zu den anderen Stressfaktoren und dem schnellen Gewebeerfall wurde eine Temperatur von 38°C für die weiteren Analysen ausgewählt.

Lichtstress. Zwei Wochen alte Pflanzen wurden aus den Standardbedingungen genommen und unter die Lichtanlage gelegt. Für die phänotypische Analyse waren die Pflanzen zwei Tage einer Lichtintensität von ca. 300-420µE ausgesetzt. Für die weiteren Analysen wurde aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten mit den restlichen Stressfaktoren eine Lichtintensität von ca. 380µE gewählt.

Oxidativer Stress induziert durch Behandlung mit Paraquat. Für den chemischen Stresseffekt wurde das Kontanktherbizid Paraquat Dichlorid (Cat. Nummer: 1910-42-5, RIEDEL DE-HAEN) eingesetzt. Es handelt sich um eine quartäre Ammoniumverbindung (Abb. 2.2), welche Superoxide und

andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS-Elemente) in der Pflanze generieren kann. Für die Behandlung der Pflanzen wurde eine Spritzmischung hergestellt (Tab. 2.1).

96%	0,2% Agrotin
2,8%	Herbizidvormischung
1,2%	Wirkstoffmischung

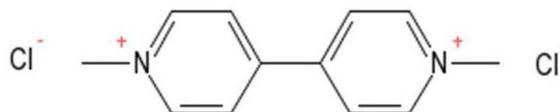


Tabelle 2.1: Spritzmischung

Abbildung 2.2: Molekulare Struktur vom Paraquat

2mg Paraquat wurden in 200 μ L Wasser aufgelöst, was eine Konzentration von 100g/ha ergibt. Die Basislösung wurde entsprechend verdünnt, so dass unterschiedliche Endkonzentrationen erreicht wurden. Die Platten wurden dann mit den Konzentrationen 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 und 50g/ha gespritzt. Die phänotypische Analyse zeigte, dass Konzentrationen von 10g/ha und höher zu derart starken Schäden führen, dass sich die Pflanze hiervon nicht mehr erholen kann. Aus diesem Grund wurde entschieden, mit einer Konzentration von 5g/ha für die Microarrays zu arbeiten.

Trockenstress. Polyethylenglykol (PEG) mit einem höheren Molekulargewicht reduziert die Transpiration und das Wasserpotenzial durch die Erhöhung der Lösungsviskosität [168, 327]. Die Senkung des Wassertransports führt zum Austrocknen der Pflanze. Zunächst mussten zwei Schwierigkeiten bei der Arbeit mit PEG gelöst werden, damit es als Trockenstressinduktor eingesetzt werden konnte. Zum einen durfte PEG nicht autoklaviert werden, da es seine strukturelle Integrität verliert. Zum anderen kann beim Mischen vom PEG mit einem autoklaviertem Wachstumsmedium die Mischung nur bei sehr niedrigen PEG-Konzentrationen polymerisieren.

Aus diesem Grund wurde eine Overlay-Lösung erstellt, welche aus PEG mit Wachstumsmedium ohne Agar besteht. Unter sterilen Bedingungen wurde sie über das fest gewordene Agarmedium gegossen. Die Platten wurden für 48h im Kühlraum gelagert. Es musste darauf geachtet werden, dass die Overlay Lösung die doppelte Konzentration an PEG enthält, die für das Agar vorgesehen ist, da beide Lösungen einen Konzentrationsausgleich anstreben, wodurch sich die Konzentration im Overlay halbiert. Für die Feststellung der richtigen PEG-Konzentration wurde eine Testreihe gestartet (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% und 70% PEG). 48 Stunden vor dem Stressbeginn wurden neue Petrischalen mit Nährmedium begossen. Nachdem das Agar polymerisiert wurde, wurden 30 ml Overlay-Mischung über das Agar gegossen und für 48 Stunden gelagert. Durch diese Art der Lagerung kann das Polyethylenglykol in das Agarmedium diffundieren. Dadurch wird das Wasserpotenzial im Nährmedium herabgesetzt.

Kurz vor Stressbeginn und unter sterilen Bedingungen wurden die Platten geöffnet und die Overlay-Lösung verworfen. Die Pflanzen wurden aus der Lang-Tag-Kammer genommen und ebenfalls unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig¹ in die neuen Platten mit dem niedrigeren Wasserpotenzial umgesetzt. Nach dem Transfer wurden die Platten in die Klimakammer zurückgebracht. Nach zwei Tagen wurde die Phänotypisierung der Platten durchgeführt. Aufgrund der phänotypischen Ergebnisse, der Wachstumsgeschwindigkeit und des Schädigungslevels der Pflanzen wurde eine PEG Konzentration von 30% für die weitere Analysen festgesetzt.

Salzstress. Die Pflanzen wurden mit Natriumchlorid (NaCl) in verschiedenen Konzentrationen gestresst. Um eine zu hohe Salzkonzentration zu vermeiden, die zusätzlich osmotischen Stress aus-

¹Die Wurzel darf nicht beschädigt werden. Mechanisch zerstörte Wurzeln erlauben den Pflanzen die Aufnahme des PEG-verdünnten Wassers. Dadurch wird der Stresseffekt reduziert oder gar gestoppt. Wenn zuviel PEG in die Pflanze eindringt, hat es eine toxische Wirkung, welche die Stressantwort verfälschen kann.

lösen würde [6], wurde die Versuchsreihe mit einer niedrigen Konzentration von 50 mM begonnen und anschließend schrittweise auf 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM und 400 mM NaCl erhöht.

Ähnlich wie beim Trockenstress wurden für das Aussetzungsverfahren der Pflanzen neue Platten vorbereitet, welche mit einer Mischung aus 1/2 MS Lösung und der entsprechenden NaCl-Konzentration gefüllt wurden. Die Pflanzen wurden am Beginn des Stresses auf die neuen Platten umgesetzt und für weitere zwei Tage unter Standardbedingungen gelagert. Es zeigte sich, dass 150 mM die höchste Konzentration ist, welche die Pflanzen überstehen können, ohne pathologische Reaktionen hervorzurufen. Dies wurde ebenfalls in anderen Experimenten nachgewiesen [161]. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten mit den anderen Stressfaktoren wurde für die weiteren Analysen die Salzkonzentration von 150mM NaCl verwendet.

UV-B Stress. Der UV-Stress wurde als einziger Stress auf transiente Weise analysiert. Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen für verschiedene Zeitperioden (10-180 Minuten) einer UV-Strahlung ausgesetzt. Die Bestrahlungsdauer sollte lang genug sein, damit die Pflanzen Stresseffekte (phänotypische als auch metabolische) aufweisen, jedoch so gewählt werden, dass pathologische Reaktionen vermieden werden können.

Nach der vorgegebenen Stressdauer wurden die Platten zurück zur Klimakammer transportiert und dort bis zur weiteren Analyse gelagert. Nach der Auswertung der Pflanzenreaktion auf UV-Stress, zwei Tage und eine Woche nach Stressanfang, wurde entschieden, dass die Aussetzungsdauer von 30 Minuten eine ähnliche Reaktionsstärke in den Pflanzen hervorruft.

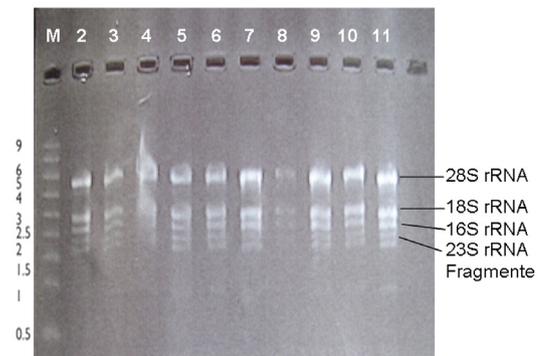
Transferstress. Zwei der sieben untersuchten Stressfaktoren beinhalten zusätzlich zum eigentlichen abiotischen Stress auch einen weiteren Faktor, der nicht unbeachtet bleiben darf. Sowohl beim Trockenstress (Seite 14) als auch beim Salzstress (Seite 14) werden die Pflanzen aus einer Platte mit einem unbehandelten Medium in eine zweite Platte mit einem neuen veränderten Medium transferiert, welches der Stress verursachende Reagenz enthält. Damit könnte ein weiterer Stressfaktor auf die Pflanzen wirken, der vom abiotischen Stress unabhängig ist. Der mechanische Stress sollte deshalb separat analysiert werden, um das Expressionsverhalten der Gene, deren Expressionswerte lediglich aufgrund des mechanischen Stresses hoch- bzw. herunterreguliert werden, von der abiotischen Stressantwort zu unterscheiden. Um dies zu erreichen, wurde eine Testreihe aufgestellt, bei der die Pflanzen keinem abiotischen Stress ausgesetzt wurden. Die Pflanzen wurden lediglich von einer Platte in eine zweite transferiert und in den gleichen Zeitpunkten wie die restlichen Stressfaktoren geerntet und eingefroren.

2.8 Nukleinsäure-Chemische Methoden

2.8.1 Vorbereitung der Proben

Für die Isolierung der gRNA wurden die Pflanzen in gefrorenem Zustand mit einer Schwingmühle (MM 300, RETSCH) vollständig gemörsert. Die Arbeit wurde komplett im Stickstoff durchgeführt, damit der RNA-Haushalt der Pflanze sich nicht mehr verändert.

Abbildung 2.3: Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten gRNA aus den Rosetten von *Arabidopsis* Pflanzen. Nachdem das Gel gelaufen ist, können die intakten ribosomalen RNA-Banden unter UV-Licht betrachtet werden. Denaturierte RNA wäre als Schmier mit einem niedrigen Molekulargewicht am unteren Ende des Gels zu sehen. M: 1kb DNA Marker, 2-5: Proben von UV-gestressten Platten, 6-8: Proben von Licht-gestressten Proben, 9-11: Kontrollproben.



2.8.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Pflanzen

Die Isolierung der gRNA wurde nach dem von Qiagen entwickelten Protokoll für die RNA-Reinigung durchgeführt [252]. Die Fällung der RNA wurde mittels Ethanol-Ammoniumacetat Präzipitation über Nacht bei -80°C durchgeführt. Das Pellet wurde mit Ethanol gereinigt, anschließend getrocknet und für die Quantifizierung wieder im Wasser gelöst.

2.8.3 Photometrische Mengenbestimmung der Gesamt-RNA

Der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit der Probe können durch eine spektralphotometrische Messung im UV-Bereich bestimmt werden. Hierbei wird die Absorption bei 260nm und 280nm gemessen. Die optische Dichte (OD) einer Nukleinsäurelösung bei 260nm (E_{260}) ist ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden. Der Wert bei E_{280} gibt Aufschluss über die Verunreinigung. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei E_{260} $40\mu\text{g/ml}$ ssRNA. Der Quotient E_{260}/E_{280} sollte um den Wert 2,0 liegen. Die Messung wird in speziellen Quarzküvetten vorgenommen, da diese keine Eigenabsorption im UV-Bereich besitzen.

Der Faktor 40 entspricht $\text{OD}=1$ bei der Wellenlänge E_{260} . Der Verdünnungsfaktor, in dem die Probe mit Wasser vermischt wurde, wird ebenfalls berücksichtigt. Nach der photometrischen Quantifizierung der Probenmenge wurde eine qualitative Analyse mittels 1,5%igem Formaldehyd-Agarosegel durchgeführt (Abb. 2.3). Auf dem Gel können die Banden für die unterschiedlich große rRNA anhand der gelaufenen Strecke identifiziert werden. Je größer das Molekül ist, desto langsamer bewegt es sich auf dem Gel. Aus diesem Grund befindet sich die größte 28S rRNA Moleküle am nächsten zum Ursprungspunkt, während die 23S rRNA Moleküle sowie rRNA-Fragmente am weitesten liegen. Anschließend wurde die Nukleinsäurekonzentration mittels Formel 2.1 in jedem Gefäß auf $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt.

$$\Sigma_{RNA} = 40 \times E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\mu\text{gRNA}}{\text{ml}} \quad (2.1)$$

2.8.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde nach dem Affymetrix Protokoll für One-Cycle cDNA Synthesis Herstellung durchgeführt [5]. Als Primer für die Initialisierung der Synthese wurde den Proben $1\mu\text{l}$ T7-(T)-24-Primer (MWG, $100\text{pmol}/\mu\text{l}$) gegeben.

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion zur Abtrennung der Nukleinsäuren aus den proteinhaltigen Lösungen wurden die „Phase-Lock Gel heavy“ Gefäße (EPPENDORF) nach dem beiliegenden Proto-

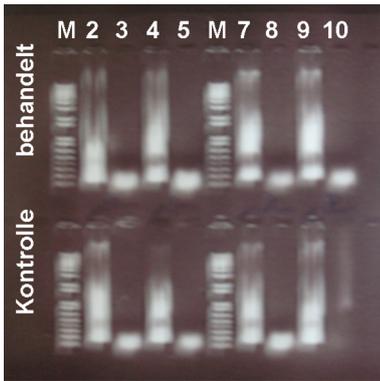


Abbildung 2.4: Das Fragmentierungsgel der cRNA Proben. Je zwei Spalten enthalten abwechselnd eine fragmentierte und eine unfragmentierte Aliquot derselben Probe. Vier biologische Replikate einer bestimmten Probe wurden auf einem Agarosegel aufgetragen. Die obere Reihe enthält die behandelten Proben, die untere die entsprechende Kontrolle. In Spalten 1 und 6 wurde der 1KB Leiter [128] als Marker (M) aufgetragen. Die Fragmentierung der vierten Kontrollprobe wurde nicht erfolgreich abgeschlossen.

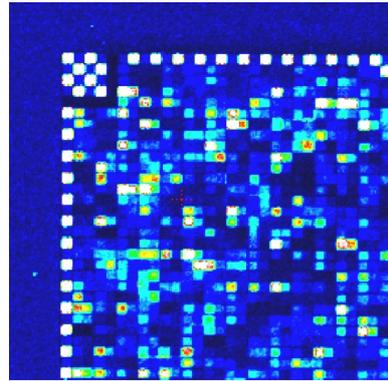


Abbildung 2.5: Beispiel für B2-Oligos in der Ecke und am Rand eines Microarrays. Positive Kontrolle für eine erfolgreiche Hybridisierung stellen die B2 Kontrolloligos dar. Sowohl das Schachbrettmuster als auch der Rand des Chips dienen als Kontrolle für die Gleichmäßigkeit des Prozesses.

koll benutzt. Der Überstand wurde in ein zweites Gefäß gegeben. Für die Fällung wurde ein Gemisch aus Ammoniumacetat, Ethanol und Glykogen verwendet. Die Zugabe vom Glykogen zum Fällungsgemisch bewirkt eine bessere Visualisierung des Pellets und vergrößert die Ausbeute [108, 314]. Das Pellet wurde dann mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Für die photometrische Quantifizierung wurden die Proben wieder in Wasser gelöst.

2.8.5 In-Vitro Transkription (IVT)

Nachdem die cDNA qualitativ und quantitativ analysiert wurde, begann die In-Vitro Transkription (IVT) nach dem Protokoll von Enzo Life Science Inc. [68]. Der IVT-Prozess produziert eine erhöhte Menge Biotin-markierter Antisense mRNA (die Markierung findet an den Basen UTP und CTP statt), welche auch als cRNA gekennzeichnet wird (Abb. 2.6). Darauffolgend wurden die IVT-Produkte gemäß dem RNeasy Mini Kit Protokoll (QIAGEN) gewaschen. Nach der Elution der Proben folgte eine weitere photometrische Messung der cRNA-Ausbeute. Für eine erfolgreiche IVT sollte die cRNA-Menge möglichst 80-100µg, mindestens 50µg, entsprechen.

2.8.6 Fragmentierung der cRNA

Damit die cRNA-Stränge an die Proben im Array anbinden können, mussten sie zunächst fragmentiert werden. Mit Hilfe von Hitze und Mg^{2+} -Ionen wurden sie zu kürzeren Sequenzen der Länge 25-200bp geschnitten (Abb. 2.6). Laut dem Affymetrix-Handbuch [5] ist dies eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Hybridisierung. Diese Länge ist optimal, um eine einheitliche Verteilung der Zielsequenzen auf der gesamten Fläche des Chips zu erreichen. Sequenzen in dieser Größenordnung minimieren die gegenseitigen sterischen Effekte, welche bei der Bindung vorkommen könnten. Die Fragmentierung erleichtert die Hybridisierung und erhöht deren Effizienz und Reproduzierbarkeit.

Die Fragmentierung erfolgte nach dem Affymetrix Protokoll für die Probenaufbereitung auf die Hybridisierung [5]. Zur Qualitätskontrolle wurden die fragmentierten Proben zusammen mit deren unfragmentiertem Gegenstück abwechselnd auf einem Agarosegel aufgetragen (Abb. 2.4). Der Schmier in den unfragmentierten Banden (2,4,7,9) deutet auf cRNA in unterschiedlichen Größen hin,

während in den fragmentierten Spalten (3,5,8,10) sich die gesamte Menge in einem Bereich konzentriert, was auf eine einzige Fragmentengröße schließen lässt. Die Spalten 1 und 6 (M) dienen als Laufkontrolle und enthalten die 1kB DNA-Leiter. Die Aliquots in der oberen Hälfte wurden der behandelten Probe entnommen, während die Kontrollproben unten aufgetragen wurden. Ein Beispiel für eine nicht korrekte Fragmentierung kann in Bahn 10 beobachtet werden. Am unteren Rand ist kein Fleck zu sehen. Dagegen ist eine schwache Markierung entlang des Gelverlaufs sichtbar.

2.8.7 Hybridisierung der Proben

Nach der Fragmentierung wurden die Proben mit dem Hybridisierungscocktail aufgefüllt. Diese Lösung enthält Salze, Blockierungsagentien und bakterielle RNA-Spikes: Control Oligo B2 3nM, 20x Control cRNA cocktail, Herings-Sperma [10mg/ml], acetyliertes BSA 50mg/ml und Hybridisierungspuffer.

Die B2 control-Oligos dienen als positives Hybridisierungssignal. Sie werden von der GCOS-Software dazu verwendet, ein sogenanntes Grid (Gitter) auf den Chip zu legen (Abb. 2.5). Schwankungen in der B2-Hybridisierungsintensität sind normal und deuten nicht auf ineffiziente Hybridisierung hin. Das Analyseprogramm legt ein Gitter über den Chip, um ihn auswerten zu können. Das alternierende Muster am Rande des Chips (hell-dunkel) und die schachbrettartige Struktur in den Ecken des Arrays werden durch die B2 Oligos angegeben und markieren die Grenzen des Chips.

Der 20x-Control Cocktail enthält eine Mischung von bakteriellen biotinmarkierten cRNA-Transkripten bestimmter Gene (BioB, BioC, BioD, Cre) in festgesetzten und bekannten Konzentrationen. Sie werden der Probe immer in derselben Menge hinzugefügt und dienen als Kontrolle für die Effizienz der Hybridisierung. Bis zur Auswertung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.9 Verwendung der Microarray für die Genexpressionsprofile-Analyse

Für alle Analysen in dieser Arbeit wurden die *GeneChip*[®] Arabidopsis ATH1 Genome Arrays der Firma Affymetrix verwendet [4]. Die ATH1 Arrays enthalten 22.810 Proben mit über 24.000 Genen. Die Information über die Gene wurde aus verschiedenen Quellen (TIGR, TAIR) gesammelt und werden auf der Seite der *NetAffx*TM Analysis Center² kontinuierlich weiter aktualisiert.

2.9.1 Vorbereitung der Chips

Als Vorbereitung für die Hybridisierung wurden die Arrays erst mit $200\mu\text{l}$ 1xMES-Hybridisierungspuffer gefüllt und im Hybridisierungsöfen (vorgeheizt auf 45°C) bei 60rpm gedreht. Das Drehen der Chips im Ofen führt zu einer gleichmäßigen Verteilung der Lösung über die Oberfläche des Chips.

Die aufgetaute Probe wurde bei 94°C für fünf Minuten inkubiert und bis zur Abkühlung wieder auf Eis gelegt. Die Gefäße wurden kurz gevortext und dann für 5 Minuten auf höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Für einen Temperaturengleich wurden die Röhrchen für fünf Minuten im Heizblock bei 45°C gelagert.

Paarweise wurden die Chips aus dem Ofen entnommen, der Hybridisierungspuffer wurde verworfen und die Chips wurden stattdessen mit dem vorgewärmten Hybridisierungscocktail gefüllt. Anschließend wurden die Chips für 16 Stunden in konstanter Bewegung hybridisiert. Am Ende des

²<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>

Hybridisierungsprozesses wurde der Hybridisierungscocktail aus dem Chip entnommen, die Chips wurden vollständig mit Puffer A befüllt und kalt und dunkel gestellt.

2.9.2 Waschen und Färben

Der Waschprozess wurde gemäß dem Affymetrix³-Protokoll durchgeführt [5]. Mit Puffer A, einem nicht-stringenten Reagenz wurden die unspezifischen cRNA-Stränge aus dem Array gewaschen. Puffer B wirkt spezifischer und sorgt dafür, dass nur solche cRNA-Sequenzen mit einer hohen Homologie auf dem Array gebunden bleiben.

Entsprechend desselben Protokolls wurden die Arrays anschließend gefärbt [5]. Die an den Arrays gebundenen biotinylierten cRNA-Zielsequenzen wurden in drei Schritten gefärbt (Abb. 2.6). Die erste Färbelösung enthält Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE). Die SAPE-Moleküle haben eine hohe Affinität zu Biotin und gehen mit diesem eine sehr stabile und selektive Bindung ein. Für die Signalamplifizierung enthält die zweite Färbelösung Anti-Streptavidin-Antikörper (Goat) und biotinylierte goat IgG Antikörper. (2.6). Die dritte Färbelösung wurde erneut mit SAPE versetzt. Diese binden jetzt an die IgG Antikörper. Dadurch wird das fluoreszierende Licht verstärkt und das Signal vervielfacht. Die Zusammenfassung aller Aufbereitungsschritte von der Ernte bis zum Scannen der Arrays wurde in Abbildung 2.6 dargestellt.

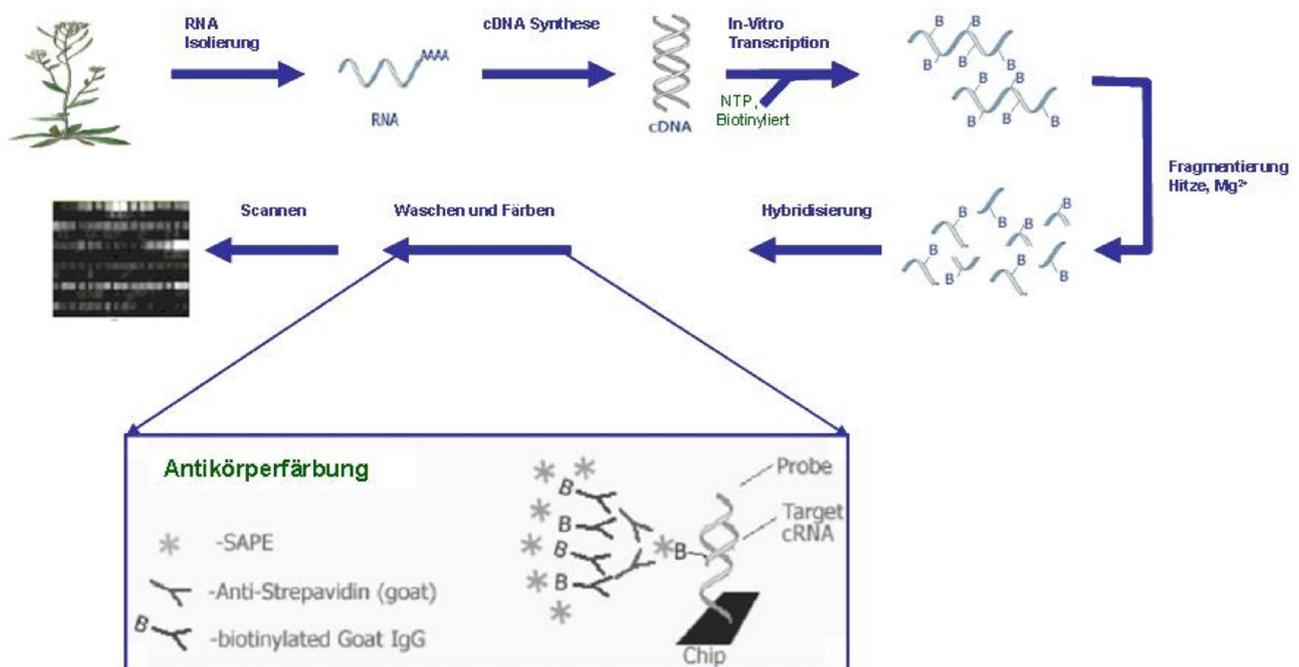


Abbildung 2.6: RNA Aufarbeitung-Workflow. Nach der Ernte folgt die RNA-Isolierung und die cDNA-Synthese. Mittels IVT wird cRNA transkribiert und die neuen Sequenzen mit Biotin markiert. Nachdem die Sequenzen fragmentiert wurden, folgt die Hybridisierung. Der Färbeprozess erfolgt in drei Schritten, beginnend mit SAPE (Streptavidin-Phycoerythrin), SAPE-Antikörper und wieder SAPE für die Signalamplifizierung. Die Lichtsignale werden gescannt und die Data im Rechner analysiert.

2.9.3 Visualisierung

Nach der Färbung müssen die SAPE-Intensitäten gemessen werden. Mit einer Bildbearbeitung Software (GCOS, *GeneChip*[®] Operating System) wurden die Chips in den Scanner (*GeneChip*[®] Scanner

³<http://www.affymetrix.com/support>

3000 AFFYMETRIX) eingelesen.

Das Programm erstellt mehrere Dateien. Die *.DAT Dateien enthalten Information über die Abbildung (Image Files), welche vom Scanner beim Einlesen der Probe generiert wurden. Aus diesen Dateien werden die *.CEL Files erstellt. Hier werden die Expressionswerte (Intensitäten) der Proben gespeichert. Die *.CHP Dateien fassen die numerischen Daten aus den beiden oberen Dateien zusammen. Die *.RPT Files sind Textdateien, welche alle wichtigen Daten über die Einstellungen der Expressionsanalyse und die Hybridisierungsintensitäten der Proben zusammenführen. Hier werden die Werte für die Qualitätskontrollen der Hybridisierung gespeichert.

2.9.4 Auswertung und Interpretation der Daten

Für die Normalisierung der Daten wurde der RMA-Algorithmus (Robust Multichip Average) verwendet [124]. Dieser wurde aufgrund seiner höheren Spezifität im Vergleich zu anderen Algorithmen gewählt [176]. Die erwartete Sensitivität wurde im Experiment durch eine konstante RNA-Menge in allen Proben und identische Grundbedingungen erreicht. Ein weiterer Vorteil von RMA ist Die Identifizierung von weniger falsch-positiven Ergebnissen als bei anderen Kondensierungsalgorithmen wie z.B. MAS5 [131].

2.10 Qualitätsanalyse der technischen Daten

Für die Qualitätskontrolle der technischen Daten wurden zwei Software-Pakete verwendet. Die *Expressionist*[®]-Software (GENEDATA⁴) unterstützt die Automatisierung des Analyseprozesses des kompletten Genoms. Sie beinhaltet Algorithmen für die Qualitätskontrolle sowie Datenbearbeitung und unterschiedliche statistische Tools. Das Refiner-Modul wertet die Qualität der Chips aus und dient als technisches Kontrollelement. Es beinhaltet die verschiedenen Normalisierungsalgorithmen und Kondensierungsmethoden. Der Analyst dient der Analyse der Microarray-Data. Er enthält mehrere statistischen Methoden für die Datenauswertung und für den Vergleich mit externen Quellen.

Die R-Softwareumgebung⁵ enthält mehrere Algorithmen für die Qualitätskontrolle und Datenextraktion für Microarrays [164]. Hierbei existieren für jeden Bereich der Genexpressionsanalyse einzelne Pakete. Mit Hilfe der R-Software wurden weitere Qualitätskontrollen durchgeführt. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit das Bioconductor-Paket⁶ verwendet, eine weitere open-source Anwendung für die Analyse und das Verständnis genomischer und metabolischer Daten.

2.10.1 Die Refiner-Analyse

Für die Automatisierung der Analyse im Refiner-Modul der *Expressionist*[®]-Software wurde ein Workflow erstellt (Abb. 2.7). Zuerst wurde die Formatierung der *.CEL Dateien überprüft. Im nächsten Schritt wurde die mittlere Intensität aller Proben in jedem Chip errechnet und Informationen über die prozentuale Menge der maskierten Bereiche und der Ausreißer in jedem Chip ermittelt (es handelt sich z.B. um Proben, deren Intensität viel zu hoch ist im Vergleich zum vom Algorithmus errechneten Mittelwert oder solche mit einem negativen Expressionswert. Diese Biases können durch technische

⁴<http://www.genedata.com/products/expressionist/>

⁵<http://cran.r-project.org/index.html>

⁶<http://www.bioconductor.org/>

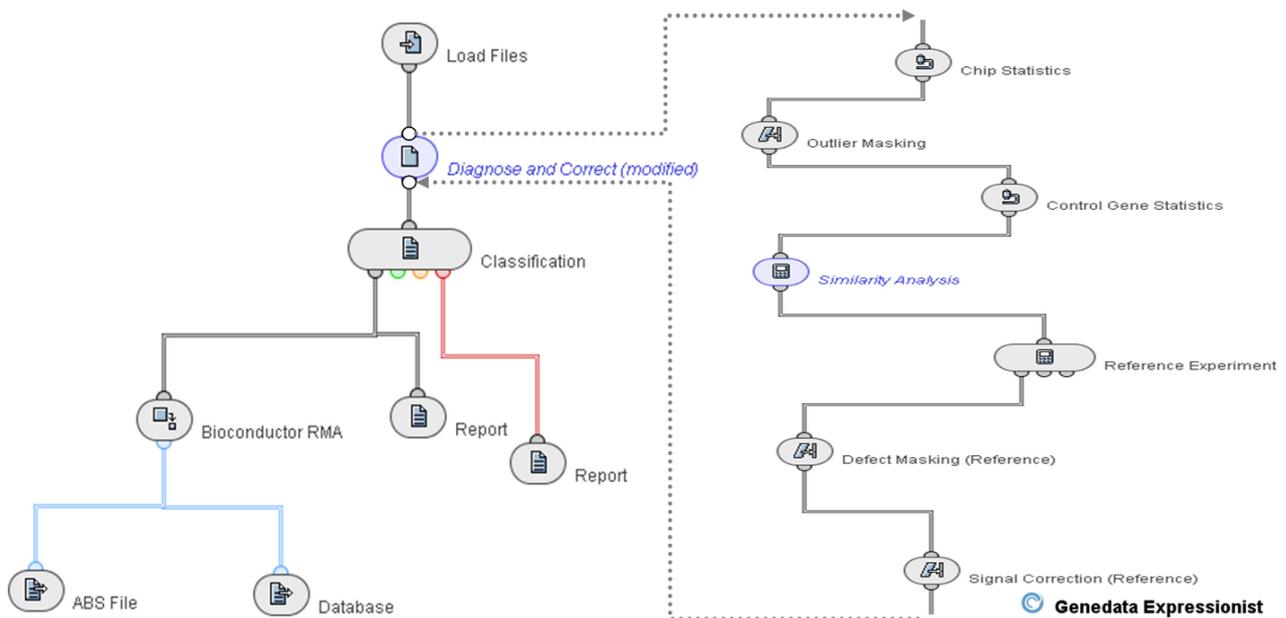


Abbildung 2.7: Der Workflow der Qualitätskontrolle im Refiner. Abgebildet werden alle Einzelschritte der Refiner-Analyse. Die einzelnen Schritte sollen sicher stellen, dass die verschiedenen Microarrays miteinander vergleichbar werden. In diesem Durchlauf werden Outliers entfernt, Hintergrundrauschen geglättet und Defekte in den Arrays entdeckt und maskiert. Die RMA-Normalisierung macht es möglich, unterschiedliche Experimente miteinander zu vergleichen. Detaillierte Informationen zu den einzelnen Schritten sind im Text aufgeführt.

Faktoren in der Chipherstellung oder durch biologische Faktoren in der Vorbereitung der unterschiedlichen Proben entstehen). Da solche Werte die Ergebnisse mancher Analysen verfälschen könnten, wurden sie markiert und im nächsten Schritt „outliers masking“ von der Analyse verborgen.

In der „Control Gene Statistics“ wurde der MAS5-Algorithmus [124] auf die nicht-kondensierten Daten angewandt, um die Qualität der Kontrollgene zu überprüfen. Die Affymetrix-Chips besitzen zwei Sets von Kontrollgenen. Die Haushaltsgene (wie GAPDH oder β -Actin) werden in der Regel unabhängig vom Entwicklungsstatus oder physiologischen bzw. pathologischen Zustand der Pflanze exprimiert. Die Expressionswerte der restlichen Gene auf dem Chip wurden über diese Gene normalisiert.

Der zweite Set besteht aus den sog. Spike-Ins. Es handelt sich um Gene aus dem *E. coli* Genom (*bioB*, *bioC*, *bioD*) und das *cre* Gen der P1 Bakteriophage. Diese Gene kommen im pflanzlichen Genom nicht vor und werden zu der Probe in variablen, vorher bekannten Konzentrationen hinzugefügt [131]. Die Expression dieser Gene wird bei der Berechnung von „biases“ (Tendenzen) der Genexpressionsprofile der *Arabidopsis*-Gene und bei der Bestimmung der Spezifität und Sensitivität des Arrays als Referenzgröße verwendet.

Im nächsten Schritt wurde eine Ähnlichkeitsanalyse („similarity analysis“) durchgeführt und ein hierarchisches Clustering mit Hilfe von Unähnlichkeitsberechnungen erstellt [133, 102]. Die paarweisen Unterschiede in den Arrays wurden gebildet und als ein hierarchischer Baum wiedergegeben. Die ähnlichen Experimente wurden zu Gruppen zusammengefasst. Die Distanz zwischen den unterschiedlichen Experimenten wurde anhand der logarithmischen Expressionswerte von jeweils zwei Experimenten bestimmt.

Für jede dieser Gruppen wurde in der darauf folgenden Referenzexperiment-Analyse eine virtuelle Referenz erstellt. Diesem lag ein globaler Mittelwert aus allen Werten in allen Arrays dieser Gruppe zugrunde. Die Arrays wurden Median-normalisiert, damit die Chips aus verschiedenen Experimenten miteinander verglichen werden konnten. In der nächsten „Defect Masking Activity“ wurden spezi-

fische Bereiche maskiert, welche im Vergleich mit dem Referenzexperiment eine zu hohe oder zu niedrige Intensität aufwiesen. Die darauffolgende „Signal Correction Activity“ errechnet mögliche Gradienten und Verformungen im Log-Log-Plot der Signalintensitäten. Falls solche Abweichungen gefunden wurden, wurde eine Korrektur angesetzt. Diese Signale wurden relativ zum Referenzexperiment errechnet.

Im Klassifizierungsschritt wurden alle Kontrollanalysen zu einem globalen Qualitätswert zusammengefasst. Die Chips wurden als „gut“, „mittel“ oder „schlecht“ klassifiziert. Aus dieser Analyse wurden Reports erstellt, welche die zusammengefassten Resultate aller Analysen enthalten.

Der nächste Kondensierungsschritt ist von zentraler Bedeutung für die Analyse. Ein sehr wichtiger Grund für die Anwendung von Microarrays ist die Frage nach den Unterschieden in der RNA-Expression zwischen einer bestimmten genetischen bzw. umweltbedingten Umgebung und einem normalen Kontrollzustand. Diese Differenzen in den Expressionslevels könnten aber nicht nur aufgrund der Konfrontation der Pflanze (oder Zelle) mit einer Stresssituation auftreten. Abweichungen in den Aufarbeitungs- oder Hybridisierungsschritten oder weitere technische Gründe können ebenfalls Unterschiede in verschiedenen Experimenten hervorrufen. Da es sich bei Affymetrix *GeneChip*[®] Arrays um One-Channel Arrays handelt, muss es möglich sein, verschiedene Chips mit einander zu vergleichen. Damit dieser Vergleich nicht durch solche technischen Störungen verfälscht wird, müssen diese Arrays normalisiert werden. Bei der Kondensierung werden die Ergebnisse der verschiedenen Proben eines Probesets mittels Kondensierungsalgorithmus zu einem Wert zusammengefasst. Diese Werte werden anschließend in die Datenbank exportiert oder als *.abs File gespeichert. Für die Analyse aller Arrays wurde der RMA-Algorithmus (Robust Multiarray Averaging) verwendet [130]. Nachdem die qualitativ schlechten Arrays aus der Analyse entfernt wurden, wurde ein zweiter Durchlauf mit den übrigen Experimenten gestartet. Der RMA-Algorithmus basiert auf dem robusten Durchschnittswert der korrigierten PM-Werte (Perfect Match, Proben mit einer 100%igen Sequenzähnlichkeit wie die entsprechenden RNA-Sequenz) [130, 342]. Die PM-Intensitäten wurden so angepasst, dass die Hintergrundeffekte entfernt werden konnten.

2.10.2 Die R-Software

Für die Qualitätskontrolle wurden insbesondere zwei Pakete verwendet. Das Affy Paket⁷ enthält die Funktionen für die Analyse von Oligonucleotide-Microarrays [83, 129]. Es benötigt eine so genannte *.CDF-Datei, welche die Information bezüglich der Position der Proben auf dem Chip enthält. Das SimpleAffy Paket⁸ [341, 340] stützt sich auf das Affy Paket und liefert mehrere Funktionen für das Lesen von Affymetrix *.CEL Files sowie phenotypische Daten.

2.11 Die Identifizierung der deregulierten Gene

2.11.1 Die Bestimmung statistisch signifikanter, differentiell regulierter Gene

Nach der Quantifizierung und Korrektur der Expressionssignale wurde ein statistischer Test angewandt, um Gene zu identifizieren, deren Expression statistisch signifikante Unterschiede zwischen einem Behandlungszustand und einer Kontrolle aufweisen. Die Resultate der Microarray-Experimente können als ein Vergleich zwischen diesen beiden Zuständen interpretiert werden. Für die Analyse der signifikant regulierten Gene wurde in dieser Arbeit ein t-Test verwendet [91]. Der t-Test bestimmt, ob

⁷<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/affy.html>

⁸<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/simpleaffy.html>

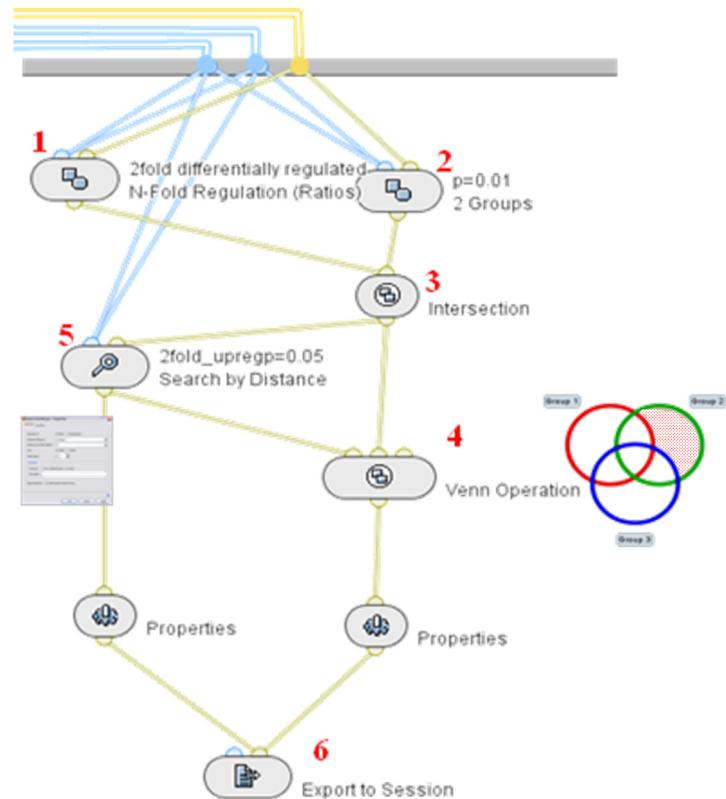


Abbildung 2.8: Die Suche nach den differentiell regulierten Genen im Analyst-Arbeitsablauf. Der Workflow stellt die verschiedenen Schritte für die Suche nach den differentiell regulierten Genen dar. In jedem Durchlauf wurden alle sechs Zeitpunkte gleichzeitig analysiert. Jeder Zeitpunkt bekam zwei Experimentgruppen (behandelt und Kontrolle) und eine Gengruppe. Die Experimente wurden Median-normalisiert. In beiden Gruppen wurden die Gene mit einem Fold-Induktion ≤ 2 ausgefiltert (1). Auf der anderen Seite wurden im t-Test die Gene weiter betrachtet, deren p-Value unter $p \leq 0.01$ lag (2). Aus diesen beiden Gruppen wurde die Schnittmenge gebildet (3). Mit Hilfe eines Venn-Diagramms (4) und der Kalkulationen der Distanzmatrix (5) wurden die Gene in „hoch“- und „herabreguliert“ unterteilt.

die Differenz in der Expression zwischen zwei Probesets signifikant genug ist (d.h. unter einem bestimmten Schwellenwert liegt). Je niedriger der p-Value ist, desto unwahrscheinlicher ist es, dass die Nullhypothese wahr ist. Das Ergebnis wird dadurch signifikanter. Ein Nachteil dieser Statistik ist die Möglichkeit für Gene mit einer sehr kleinen Varianz einen hohen p-Wert zu erzielen. Dadurch wird für diesen Vergleich ein kleiner p-Value errechnet. Solche falsch-positiven Gene, die fälschlicherweise als signifikant deklariert wurden, können die korrekte Interpretation der Resultate verhindern. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde der Algorithmus von Benjamini & Hochberg zur Kontrolle des FDR-Wertes (False Discovery Rate) angewandt [26, 27]. Mit diesem Wert wird nicht nur die Wahrscheinlichkeit einer einzigen, fälschlicherweise verworfenen Hypothese kontrolliert. Mit diesem Algorithmus wird der zu erwartende Anteil fälschlicher Verwerfungen in allen Hypothesen kontrolliert.

Nach der Normalisierung im Refiner wurden die Experimente in den Analyst geladen. Diese Software wurde dann benutzt, um die signifikanten, differentiell regulierten Gene zu identifizieren. Gene, deren Expression den Schwellenwert von 2-facher Expressionsintensität im Vergleich zu den Kontrollexperimenten unterschritten hatten, wurden aus den weiteren Analysen verworfen (Fold-Change ≥ 2). Für die Gene, welche diesen Filter bestanden haben, wurde der t-Test durchgeführt. Es wurden Gene gesucht, deren Signifikanz mit einem p-Value von höchstens $p = 0.01$ festgelegt wurde. Um dem Problem der „multiplen Testing Hypothese“ entgegenzuwirken, wurde der FDR-Wert mit Hilfe des Benjamini-Hochberg Algorithmus errechnet [26, 283].

Für diesen Schritt wurde der in der Abbildung 2.8 dargestellte Workflow erstellt. Als Eingabe wurden zwei Gruppen für jeden Zeitpunkt genommen (Kontrolle und behandelte Gruppe). Nach der Normalisierung aller Experimente wurde die Analyse in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden mittels einer Fold-Regulation-Analyse alle Gene mit einem Fold-Induktionswert unter 2.0 ausgefiltert

Tabelle 2.2: Die Bibliothek der Gensetanreicherungsanalyse.
Für die GSEA-Analyse wurden Informationen aus verschiedenen Quellen verwendet. Ergebnisse früherer Experimente wurden benutzt, um die Qualität der Ergebnisse zu überprüfen. Mit der Information über die Gene aus weiteren Quellen wurde das Verhalten unterschiedlicher Gengruppen mit einer gemeinsamen Funktion oder identischen Annotation unter verschiedenen Stressbedingungen anhand der Akkumulation bestimmter Gensignaturen identifiziert.

Kategorie	Gruppen	Anzahl	Quelle
Experimente	Kilian et al.	161	[148]
	Ma et al.	75	[189]
	Weston et al.	72	[337]
	Ramonell et al.	27	[255]
GO-Kategorien	biologische Prozesse	2544	[311] ⁹
	molekulare Funktion	1720	
	zelluläre Komponente	477	
Pathways	KEGG	139	[139] ¹⁰
	AraCyc	239	[219] ¹¹
	Mapmann	1039	[312] ¹²
	Pathway Studio	5	[226]
Transkriptionsfaktoren	Bindestellen (TransBCS)	157	[71]
	DATF	69	[302] ¹³
Protein-domäne	Pfam	2801	[74] ¹⁴
	TMHMM	15	[303] ¹⁵
	TargetP	6	[303] ¹⁶
	Kinasen	129	
Bibliothek:		13222	

(1). Mit dem t-Test wurde die Signifikanz der differentiell regulierten Gene mit einem Schwellenwert von $p=0.01$ begrenzt (2). Für die weitere Analyse wurden ausschließlich die Gene in der Schnittmenge dieser beiden Gruppen herangezogen (3). Diese wurden dann in „hoch-“ (Venn-Diagramm, 4) und „herabreguliert“ (search by distance, 5) aufgeteilt. Die Methode der Suche nach Distanzen verwendet ein vorgegebenes Referenzprofil. Das Expressionsverhalten aller Gene wird mit diesem Profil verglichen. Die Gene wurden anschließend in zwei Gruppen unterteilt. Dadurch wurde die Gruppe der hochregulierten Gene isoliert. Mit dem Venn-Diagramm wurde dagegen die Gruppe der herabregulierten Gene identifiziert. Die beiden Gruppen wurden für weitere Analysen an den Analyst weitergeleitet (6).

2.12 Analyse der abiotischen Stressreaktion mittels Gensignaturen

Mit DNA-Microarrays werden gleichzeitige Veränderungen im Expressionsverhalten mehrerer Gene beobachtet und identifiziert. Bei geringen Unterschieden auf der Genebene stellt sich diese Aufgabe jedoch als eine Herausforderung dar. Die Gensetanreicherungsanalyse (GSEA) ermöglicht die Erkennung solcher feinen, aber letztendlich koordinierten, Differenzen in Gengruppen, welche eine gemeinsame bzw. verwandte Funktion besitzen [216, 299]. GSEA versucht nicht die Unterschiede in den individuellen Genen zu finden, sondern durchsucht die Daten auf dem Level von biologischen Signalwegen bzw. gleichzeitig regulierten Gensets. In einer „Gene Set Enrichment“-Analyse wird die differentielle Expression von Gengruppen untersucht. Das bedeutet, dass die statistische Anhäufung extremer Expressionswerte eines vordefinierten (!) Genesets evaluiert wird.

Für die Analyse der Anreicherung von Gengruppen wurden Informationen aus verschiedenen Quellen verwendet (Tab. 2.2). Die Resultate aus bekannten abiotischen Stressexperimenten wurden mit den Daten in dieser Arbeit verglichen [148, 337, 189, 255]. Die Differenzen in den Ergebnissen zwischen dieser Arbeit und den in der Bibliothek gespeicherten Experimenten zeigen die Wichtigkeit eines identischen Stresslevels für den Vergleich unterschiedlicher Stressfaktoren. Für die Bestimmung von überrepräsentativen Gensignaturen wurden GO-Annotationen (Gene Ontology), Informationen über Signalwege, Proteine sowie Transkriptionsfaktorbindestellen verwendet (Tab. 2.2). Für die Kategorisierung der GO-Annotationen wurden die Daten aus zwei Quellen entnommen. Die

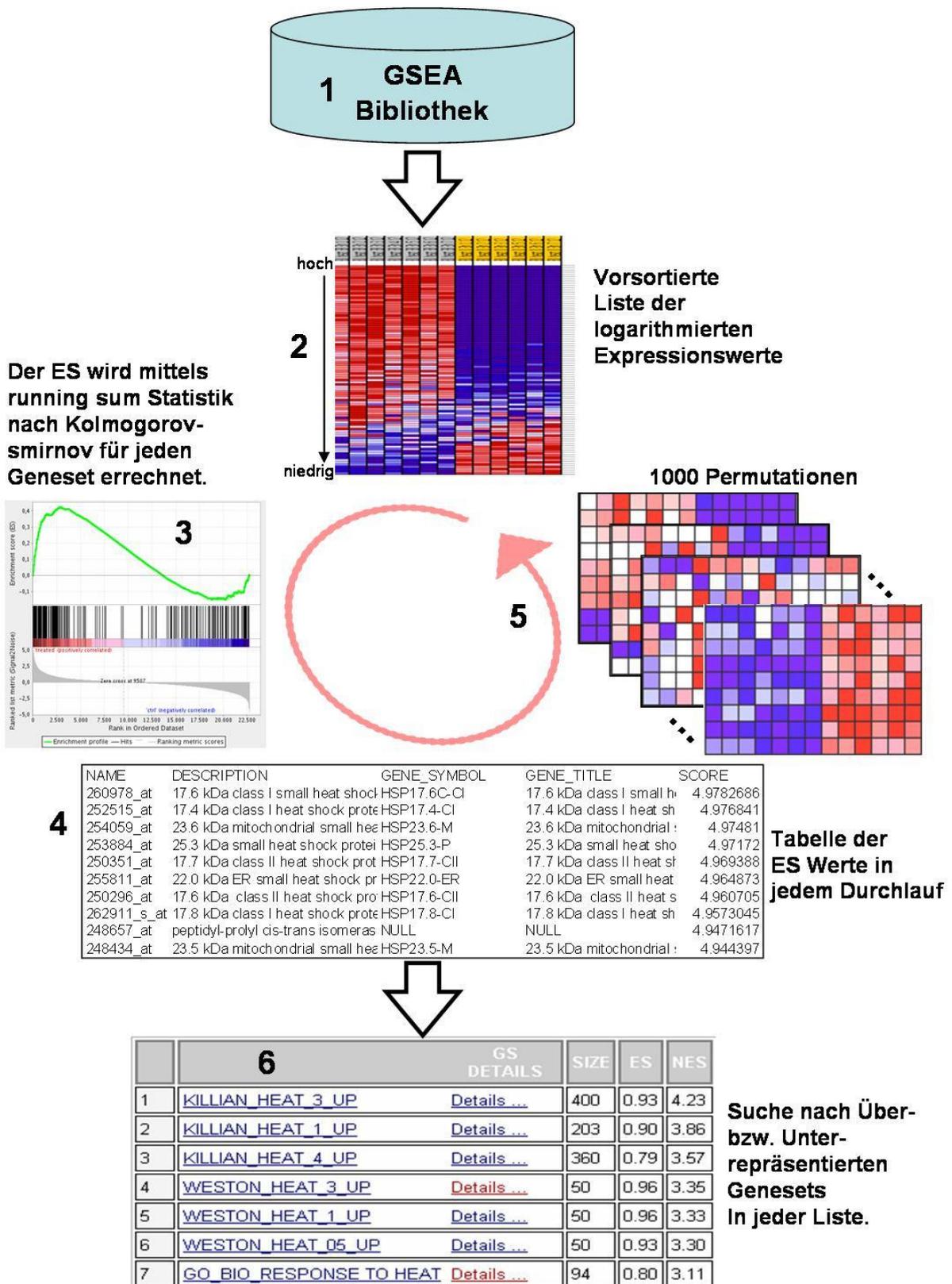


Abbildung 2.9: Arbeitsablauf der Gensetanreicherungsanalyse. Eine Bibliothek wurde aus den verschiedenen Quellen erstellt (Tabelle 2.2) (1). Im zweiten Schritt wurden die zu vergleichenden Gene nach den Expressionsdifferenzen im Vergleich zur Kontrolle absteigend sortiert (2). Mittels der „running sum-Statistik“ (Algorithmus nach Kolmogorev-Smirnov, [113]) wurden die Gengruppen für Anreicherungen bestimmter funktioneller Gruppen durchsucht (3). Ein sog. ES-Wert (Enrichment Score) wurde für jede Gengruppe errechnet (4). Die Prozedur wurde für jede Gruppe 1000 Mal mit verschiedenen Permutationen wiederholt (5). Anschließend wurden die Ergebnisse kategorisch nach absteigenden ES-Wert sortiert (6).

BLAST-Suchergebnisse, welche nach lokalen Parametern durchgeführt wurden, und die Datensätze der AmiGo-Datenbank¹⁷ [311] wurden parallel verglichen, um die Ergebnisse zu verifizieren. Die Information über Signalübertragungswege wurde den Datenbanken KEGG [139], AraCyc [219] und Mapman [312] entnommen. Die Angaben über Transkriptionsfaktoren und Bindestellen stammen von der DATF-Datenbank ab [302]. Als zweite Informationsquelle hierfür diente die TransBCS-Datenbank zur Durchsuchung der proximal gelegenen Promotorregionen nach spezifischen Sequenzmotiven [71]. Die Informationen über Zellkomponenten, Transmembranproteine oder Proteinziele wurden aus der TAIR-Datenbank genommen [303]. Das Wissen über Proteinkinasen wurde der InterPro-Datenbank [10] entnommen und in der lokalen Bibliothek gespeichert.

Der GSEA-Algorithmus vom Broad Institute¹⁸ wurde in dieser Analyse benutzt, um Muster in der Akkumulation der Gensignaturen zu bestimmen. Die Vorgehensweise dieser Analyse ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Als erster Schritt wurden die errechneten Expressionswerte aller Gene in jedem Behandlungszustand addiert und gemittelt, vom Wert der Kontrolle derselben Gengruppe abgezogen und logarithmiert. Die Werte wurden absteigend sortiert und mit den einzelnen Gruppen in der Bibliothek verglichen. Für jede der Genlisten wurde mit Hilfe der „running sum“ Statistik [113] ein Anreicherungswert errechnet. Die Berechnung wurde mit Permutationen 1000 Mal wiederholt, um das Problem der multiplen Hypothesen Testing zu korrigieren. Eine Korrelation zwischen der Genliste und einem Datensatz deutet darauf hin, dass Gene, die sich in einem gemeinsamen Signalübertragungsweg befinden oder die eine bestimmte Funktion oder ein bestimmtes Motiv aufweisen, in dieser Gruppe überrepräsentativ angereichert vorkommen. Eine umgekehrte Akkumulation weist eine antagonistische Reaktion der spezifischen Gengruppe in dieser Behandlung auf.

Für jeden Stressfaktor wurden die Gene aus den behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe verglichen und in jedem Zeitpunkt getrennt analysiert. Die Ergebnisse wurden anschließend nach den errechneten ES-Werten absteigend sortiert und nach deren funktionellen Gruppen kategorisiert. Die Analyse wurde für die hoch- bzw. herabregulierten Gene separat in Tabellen zusammengefasst.

2.13 Die Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen

Die Idee hinter der Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen-Analyse (TFBS) basiert auf der Annahme, dass Gene mit identischen Funktionen von den gleichen Transkriptionsfaktoren korreguliert werden. Für diese Analyse wurde eine TFBS-Datenbank erstellt. 1000bp stromaufwärts vom Transkriptionsanfang jedes Gens im *Arabidopsis*-Genom wurde nach konservierten Sequenzen von bekannten Bindestellen durchsucht [71]. Diese wurden in einer Datenbank gespeichert. Für jeden Zeitpunkt in jedem Stressfaktor wurden die differentiell regulierten Gene mit dieser Datenbank verglichen. Es wurde nach den Akkumulationen bestimmter Sequenzmotiven mittels eines Fisher's Exact Tests gesucht [75]. Überrepräsentative TFBS-Sequenzen mit einem $p\text{-Value} \leq 10E^{-3}$ wurden als signifikant betrachtet.

2.14 Zeitreihenanalyse

Bei der Analyse der Veränderungen der pflanzlichen Reaktion nach der Zeit wurden zwei Methoden angewandt. Als erster Schritt wurde die Reaktion der Pflanze über alle Zeitpunkte hinweg analysiert.

¹⁷<http://www.geneontology.org/>

¹⁸www.broadinstitute.org/gsea/

Die zweite Methode konzentrierte sich auf die Expressionsunterschiede zwischen zwei benachbarten Zeitpunkten.

Für die Analyse des Expressionsverhaltens aller Zeitpunkte wurde das samr-Paket¹⁹ verwendet [85, 319]. Es wurden Gene gesucht, deren Expressionsverhalten zu einem von drei bestimmten Mustern passt. Gene mit einer kontinuierlich steigenden Expressionsintensität, kontinuierlich sinkender Intensität oder solche, deren Expressionsmaximum in einem mittleren Zeitpunkt liegt. Solche Gene wiesen einen transienten Expressionsverlauf auf. Um das multiple Testing Problem zu reduzieren, wurde der FDR-Schwellenwert $\leq 1\%$ gesetzt. Alle Gene unterhalb dieser Grenze wurden weiter betrachtet. Die Gene mit einem transienten Expressionsverhalten wurden anschließend mit einem K-means Clustering-Algorithmus weiter analysiert [101]. Mit Hilfe dieses Clustering-Algorithmus sollten die Gene in weitere Gruppen unterteilt werden, die ein spezifisches Expressionsmuster aufweisen.

Im zweiten Schritt wurden explizit die Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten untersucht. Für diese Analyse wurde das LIMMA-Paket²⁰ benutzt [85, 294]. LIMMA unterstützt die Analyse differentiell regulierter Gene mit Hilfe linearer Modelle. In jedem Schritt wurden die differentiell regulierten Gene zweier benachbarter Messungspunkte miteinander verglichen. Gesucht wurden die Gene, welche in der aktuellen Messungseinheit signifikant dereguliert wurden, im Zeitpunkt davor dagegen keine signifikante Expression aufgewiesen hatten. Die so gefundenen Gene wurden mittels eines auf GO-Annotationen basierenden Fisher's Exact Tests nach deren funktionellen Annotationen kategorisiert.

¹⁹<http://www-stat.stanford.edu/tibs/SAM/>

²⁰<http://bioinf.wehi.edu.au/limma/>

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Etablierung des experimentellen Designs

Dieses Projekt untersucht u.a. das Verhalten der Pflanzen unter verschiedenen abiotischen Stressfaktoren. Ein Stresskompendium der pflanzlichen Reaktion auf die unterschiedlichen Stressfaktoren wird angestrebt. Mit einem solchen Kompendium ist es möglich, die Stressreaktionen miteinander zu vergleichen. Ähnliche Signalwege bzw. regulatorische Reaktionen können so leichter identifiziert und damit die pflanzliche Stressantwort besser verstanden werden. Als Teil dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, ein experimentelles Design für eine mögliche vergleichende Analyse verschiedener Stressbedingungen zu erstellen. Dafür wurden verschiedene Stressfaktoren aufgrund ihres immensen Einflusses auf das Erntevolumen der Nutzpflanzen gewählt. Für drei wichtige Stressfaktoren (Hitze, Trockenheit und UV-Licht) wurde eine weiterführende Analyse der Stressantwort durchgeführt. Diese Faktoren wurden aufgrund des auffälligen Verhaltens der Pflanzen ausgesucht. Hitze indiziert in Pflanzen eine starke und schnelle Reaktion, Trockenheit dagegen eine sehr geringe Anzahl an Genen, dafür aber eine intensive Antwort. UV-Stress zeigt eine stetig steigende Genanzahl, die nach 24h plötzlich einbricht. Mit dem in dieser Arbeit erstellten Kompendium können die deregulierten Gene bestimmten Stressfaktoren zugeordnet werden. Es stellt die Grundstruktur für nachfolgende Analysen. In den darauffolgenden In-Depth-Analysen wurde auf bestimmte Stressfaktoren konzentriert. Diese drei Faktoren stellen ein besonderes Interesse für die veränderten klimatischen Bedingungen in der Agrarwirtschaft dar und weisen ein auffälliges Expressionsverhalten auf.

Die unterschiedlichen Stressfaktoren aktivieren diverse Mechanismen mit verschieden starker Wirkung in der Pflanze. Ein möglicher Weg für die Bestimmung der Stressintensität ist der Vergleich sichtbarer Veränderungen. Aus diesem Grund wurde hier im Gegensatz zu früheren Experimenten ein einheitliches phänotypologisches Niveau für alle analysierten Stressfaktoren angestrebt. Ein weiterer Faktor für die Suche nach einer gemeinsamen Vergleichsmöglichkeit ist die Auswertung der Ertragsverluste anhand der Stressintensitäten. Im feldrelevanten Bereich werden solche Analysen erst dann interessant, wenn die Daten bonitiert werden können. Ohne erkennbare Veränderungen können solche Experimente nicht verifiziert und wiederholt werden.

Vorversuche wurden durchgeführt, um diese Ziele zu erreichen. Sie sollten garantieren, dass der Stresslevel in den unterschiedlich wirkenden Stressfaktoren so ähnlich wie möglich ausfällt. Dafür wurde eine Reihe von Analysen mit verschiedenen Stressperioden (UV-Stress), Konzentrationen (Salzstress, Behandlung mit Paraquat oder Polyethylenglykol) oder unterschiedlichen Temperaturen (Hitze, Kälte) durchgeführt. Die Phänotypen aller Stressfaktoren wurden 48 Stunden nach Stressbe-

Stressfaktor	analyisierte Bedingungen	Endkonzentration bzw. -dauer
Kältestress	2°C - 10°C	5°C
Hitzestress	38°C - 48°C	38°C
Lichtstress	200µE - 450µE	~380µE
Trockenheit (PEG)	5% - 60% PEG	30% PEG
Salzstress (NaCl)	50mM - 400mM NaCl	150mM
Oxidativer Stress (Paraquat)	0.1g/ha - 100g/ha	5g/ha
UV-Stress	Bestrahlung für 10-90 Minuten	30 Minuten

Tabelle 3.1: Bestimmung der Stressbedingungen anhand phänotypischer Analysen. In der Tabelle werden die analysierten Stressfaktoren aufgelistet. In der mittleren Spalte wurde der Bereich der untersuchten Bedingungen für die Festlegung der nötigen Konditionen in der Analyse dargestellt, um einen einheitlichen Stresslevel zu erreichen. Die rechte Spalte gibt die ausgewählte Konzentration bzw. die Dauer der Behandlung für die entsprechenden Analysen an.

ginn verglichen und die passenden Bedingungen für die weiteren Analysen anschließend festgelegt.

Stressinduktion: Zwei Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen wurden den genannten Arten abiotischem Stressfaktoren ausgesetzt. Hitzestress wurde bei 38°C, Kälte bei 5°C analysiert. Trockenheit wurde durch 30% PEG induziert, Salzstress mit 150mM NaCl. Oxidativer Stress wurde mit einem chemischen Herbizid, Paraquat appliziert. Bei Lichtstress wurden die Pflanzen einer stärkeren Lichtintensität von ca. 380µE, bei UV-Stress 30 Minuten UV-Licht ausgesetzt. Tabelle 3.1 gibt alle Stressfaktoren mit den verschiedenen analysierten Parametern an. Die Parameter in der rechten Spalte stellen die Endbedingungen dar, mit denen ein vergleichbarer Phänotyp für die unterschiedlichen Stressfaktoren erreicht wurde. Diese Stresskonditionen wurden anschließend für die In-Depth-Analyse der verschiedenen Stressfaktoren ausgewählt.

3.1.1 Kältestress

Kältestress ist ein sehr wichtiger abiotischer Stressfaktor, den Pflanzen aufgrund ihrer sessilen Eigenschaften zu bewältigen haben. Eine Pflanze begegnet in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung unterschiedlichen Temperaturbedingungen, so wie auch Kälte. Die Effekte der Kältebedingungen auf die Pflanze hängen vom Stresslevel sowie von der Dauer des Stresses ab [295]. Für die Bestimmung der richtigen Temperatur wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Temperaturen gestartet. Die Pflanzen sollten zwar einen bestimmten phänotypischen Effekt aufweisen, den Stress aber überleben.

14 Tage alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden einem Kältestress von verschiedenen Temperaturen im Temperaturbereich vom 2°C-10°C ausgesetzt. In Abbildung 3.1.A, Spalte 1 sind die phänotypischen Veränderungen bei einer Temperatur von 5°C dargestellt. Mit der Dauer der Kälteperiode wird der Wachstumsprozess verlangsamt. Die Pflanzen sind kleiner und weisen weniger Blattpaare im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollpflanzen auf. Sie besitzen kürzere Petiolen sowie kleinere Blätter. Der Aufbau der Wurzel wird ebenfalls durch den Kältestress beeinträchtigt. Unter längerem Kältestress wirkt die Hauptwurzel kleiner und enthält kaum Verzweigungen.

Abbildung 3.1.B zeigt den Phänotyp der *Arabidopsis* Pflanzen nach 48 Stunden Dauerstress bei 2°C. Hier sind schon Anzeichen für das Einleiten des programmierten Zelltodes erkennbar. Die Pflanzen weisen nekrotische Bereiche in den Blättern auf. Die Epykotle werden rot. Dies ist ein Hinweis auf die Vermehrung der ROS-Elemente in den Zellen. Kältestress führt bei längerem Stress sogar zum Zerfall des Gewebes und zu beschleunigter Seneszenz [96].

Die Stressintensität unter konstanter Kälte von 2°C zeigt für einen phänotypologischen Vergleich verschiedener Stressfaktoren zu große Schäden. Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten mit Hitze- und Lichtstress wurde für den Kältestress eine Temperatur von 5°C gewählt.

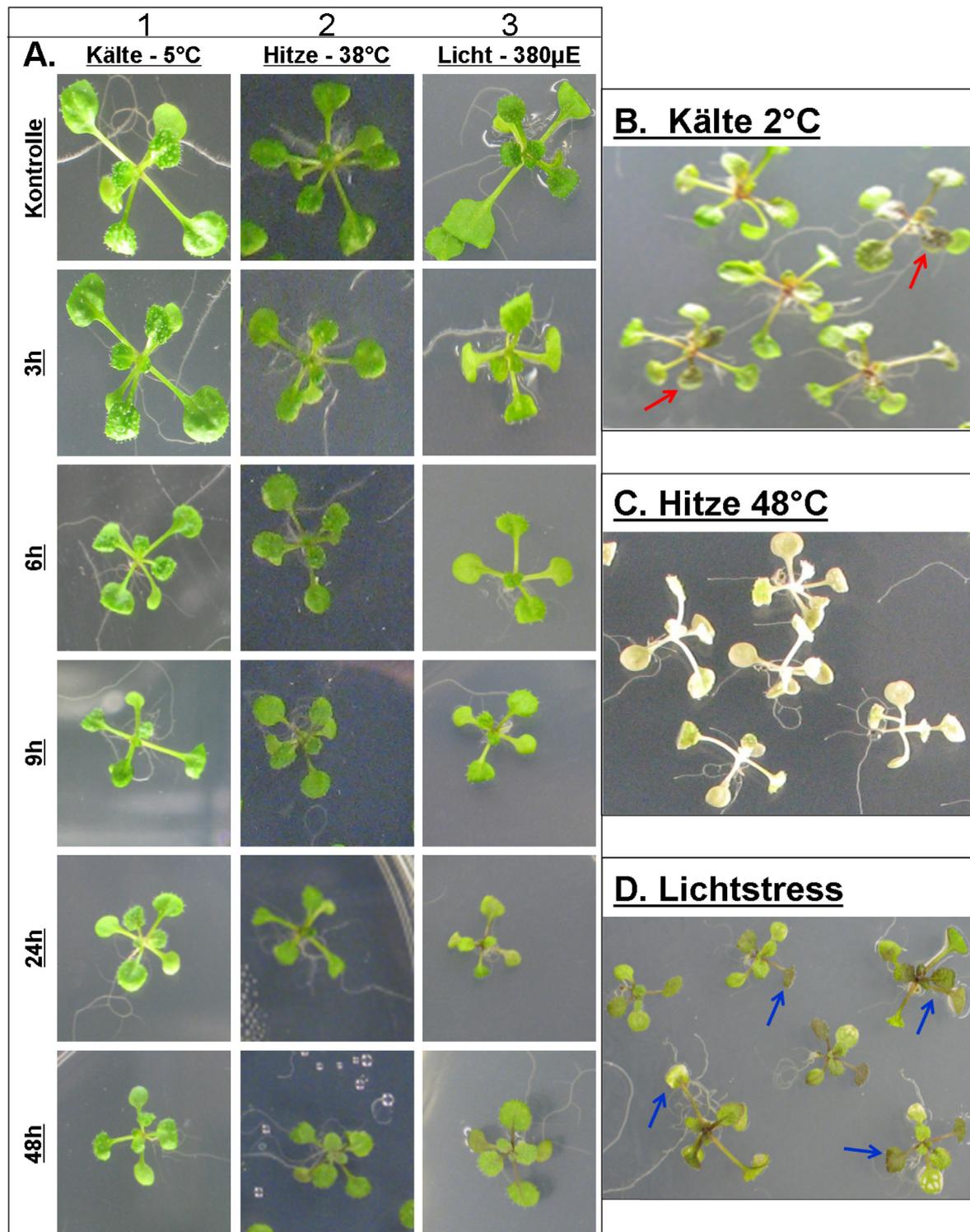


Abbildung 3.1: Vorversuche: Bestimmung der Stressbedingungen unter Hitze-, Kälte- und Lichtstress

14 Tage alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. (A) Unter den entsprechenden Bedingungen zeigen Pflanzen unter Kälte-, Hitze- und Lichtstress einen vergleichbaren Phänotyp. Alle drei Stressfaktoren verursachen eine Verlangsamung der Wachstumsrate. In allen drei Fällen werden Blätter mit der Dauer des Stresses heller und weisen erste Anzeichen der Seneszenz auf. Die rote Färbung unter erhöhten Stressbedingungen ist ein erstes Anzeichen für die Akkumulation von Anthocyanen. (B-D) zeigen die Auswirkungen extremerer Stressbedingungen während der Vorversuche unter kälteren (B) oder heißeren (C) Temperaturen bzw. einer stärkeren Lichtintensität (D). Die in (B) und (D) mit Pfeilen markierten Pflanzenteile zeigen die ersten Symptome des eingeleiteten programmierten Zelltodes.

3.1.2 Hitzestress

Hitzestress kann das Erntevolumen sehr stark beeinflussen [213, 157]. Er führt zu Störungen im zellulären Gleichgewicht und Verzögerungen im Wachstum sowie in der Entwicklung der Pflanze. Die Anwesenheit von über 20 bekannten Hitzeschockfaktoren im *Arabidopsis*-Genom zeigt die Bedeutung dieses Stresses für die Pflanze und die Komplexität der Antwort.

Hohe Temperatur über längere Zeit führt zu zellulären Schäden und Zelltod. Eine subletale Dosis ruft dagegen eine erhöhte Thermotoleranz hervor. Daher war es von größer Bedeutung, die richtigen Bedingungen für einen phänotypologischen Vergleich der Stressfaktoren zu finden. Hierzu wurden Temperaturen im Bereich 48°C-38°C getestet. Die Vorversuche haben bei der höchsten Temperatur begonnen und die Temperatur wurde solange herabgesetzt, bis die gewünschte phänotypische Reaktion erreicht wurde.

In Abbildung 3.1.A, Spalte 2 wird der Phänotyp der Reaktion der *Arabidopsis*-Pflanzen auf Hitzestress in den verschiedenen Zeitpunkten bei 38°C dargestellt. Die Pflanzen weisen ein verlangsamtes Wachstum auf. Bei längerer Stressdauer wird der Anteil an zellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS-Elementen) erhöht [9, 352]. Die rote Färbung an den Stängeln und Blattansätzen deutet auf die Akkumulation des gegen ROS-Elemente schützenden Sekundärmetabolits Anthocyan hin [119, 257].

Abbildung 3.1.C stellt den Phänotyp der *Arabidopsis*-Pflanzen unter erhöhten Hitzebedingungen (48°C) 24 Stunden nach Stressbeginn dar. Die Pflanzen weisen ein stark geschädigtes Gewebe auf. Der programmierte Zelltod ist weit fortgeschritten. Fast die komplette Pflanze zeigt Bleaching-Merkmale. Von solchen Schäden können sich die Pflanzen nicht mehr erholen. Bei 48°C ist der Stresslevel sehr hoch. Die behandelten Pflanzen weisen für die vergleichende phänotypologische Analyse zu hohe Schäden auf. Darüber hinaus ist es nicht mehr möglich, aus diesen Pflanzen RNA zu gewinnen. Aufgrund der phänotypischen Similarität mit dem Kältestress und dem moderaten Stresslevel wurde eine Temperatur von 38°C als geeignet erachtet und für die weiteren Analysen verwendet.

3.1.3 Lichtstress

Eine plötzliche Erhöhung der Lichtintensität führt in der Pflanze zu einer Umstellung der metabolischen und physiologischen Prozesse. So erhöht sich dabei z.B. der Anteil an ROS-Elementen in der Zelle, es erfolgt eine Anpassung der photosynthetischen Prozesse sowie eine Vergrößerung des Vorrats an antioxidativen Metaboliten [196].

Die Lichtstärke in dieser Arbeit unter Normalbedingungen beträgt 30 μ E. Während der Vorversuche zur Festlegung der optimalen Lichtintensität wurden bei 14 Tage alten Pflanzen unter einem Lichtstress von 380 μ E bereits nach drei Stunden starker Lichtintensität eine hellere Blattfarbe festgestellt (Abb. 3.1.A, Spalte 3) Dies deutet auf eine Verminderung der Chlorophyllmenge in der Zelle hin. Nach 24 Stunden wurde eine rote Färbung auf den Stängeln und Petiolen deutlich sichtbar. Ähnlich wie bei der Hitzestressantwort und unter extrem kalten Bedingungen dient die Akkumulation der chemoprotektiven Anthocyanmoleküle als Schutz gegen die freigesetzten ROS-Elemente [325, 202, 203].

In Abbildung 3.1.D wird der Phänotyp des Lichtstresses bei einer stärkeren Lichtintensität von ~450 μ E dargestellt. Hier wurden die Stressmerkmale deutlicher sichtbar. Die Blätter wirken verbrannt und weisen nekrotische Symptome auf. Aufgrund dieser phänotypologischen Analyse wurde die Lichtintensität von ~380 μ E für die weiteren Experimente als geeignet festgestellt.

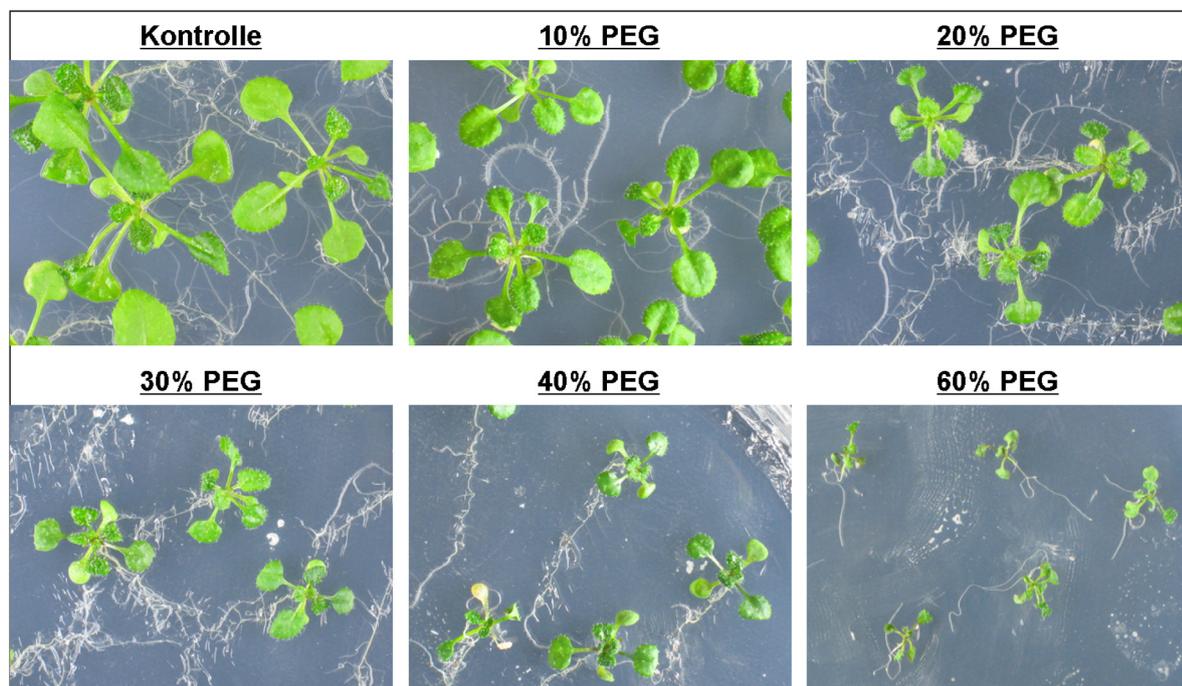


Abbildung 3.2: Phänotypische Vorversuche: Bestimmung der trockenheitsinduzierten Stressbedingungen. 14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden auf mit PEG vorbehandelte Platten transferiert. Bei niedrigen Konzentrationen sind keine Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und der Behandlung erkennbar. Dagegen führen höhere PEG-Konzentrationen zu einem deutlichen Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit. Gleichaltrige Pflanzen besitzen weniger Blätterpaare als die Kontrollpflanzen. Bei starkem trockenheitsinduziertem Stress werden die Blätter eingerollt, um den Wasserverlust noch weiter zu reduzieren. Der Hauptwurzel ist sehr lang und weist kaum Verzweigungen auf.

3.1.4 Trockenstress

Wasserstress kann unter anderem durch Trockenheit induziert werden. Die Veränderung des Wasserpotenzials im Boden ruft einen zusätzlichen osmotischen Stress hervor und bringt die ionische Homoöstatik aus dem Gleichgewicht. In der physiologischen Reaktion der Pflanze auf Trockenheit werden mehrere zelluläre Prozesse aktiviert. Einer der Effekte des trockenheitsinduzierten Stresses ist die Verminderung der Wachstumsrate [64].

Abbildung 3.2 stellt die phänotypischen Veränderungen in 14 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen mit den analysierten PEG-Konzentrationen dar. Niedrige PEG-Konzentrationen zeigen keine sichtbaren phänotypischen Veränderungen. Bei PEG-Konzentrationen über 30% verlangsamt sich die Wachstumsgeschwindigkeit mit steigenden PEG-Konzentrationen stark. Die Nodien werden kürzer und die Blattoberfläche kleiner, je intensiver der Stress wird.

Bei höheren Konzentrationen sind erste Anzeichen für die Einleitung des programmierten Zelltodes erkennbar. Die Pflanzen weisen Bleaching-Merkmale und nekrotische Bereiche auf. Um die Effekte des Stresses zu reduzieren, werden die Blätter bei den höheren Konzentrationen nach Innen eingerollt. So verkleinert die Pflanze die Blattoberfläche und die Spaltöffnungen werden weiter eingeschlossen. Die Hauptwurzel der behandelten Pflanze ist lang und weist weniger Verzweigungen auf. Dadurch werden vermutlich Energie und Mineralstoffe gespart und die Chance, Wasser zu finden, vergrößert.

Aufgrund der vorliegenden Resultate des phänotypologischen Vergleiches wurde entschieden, die weiteren Analysen für die Induktion des trockenheitsbedingten Stresses mittels PEG8000 mit einer

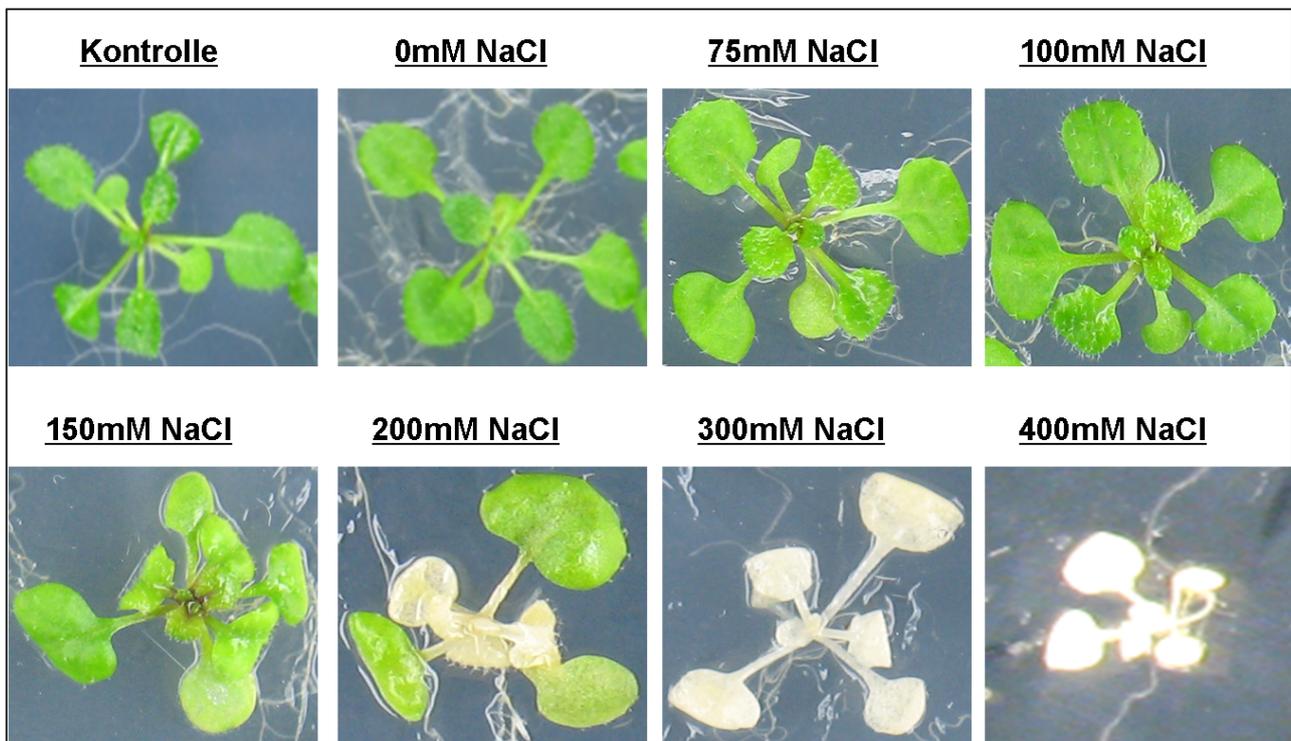


Abbildung 3.3: Phänotypische Analyse des Salzstresses mit verschiedenen Salzkonzentrationen. 14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden verschiedenen Salzkonzentrationen ausgesetzt. Behandelte Pflanzen mit NaCl-Konzentrationen ab 200mM weisen zu starke Bleaching-Merkmale auf.

Konzentration von 30% durchzuführen. Dies entspricht am ähnlichsten dem Phänotyp der Hitze- oder Kältestressfaktoren.

3.1.5 Salzstress

Die Versalzung der Erdoberfläche ist ein weit verbreitetes Problem der Agrarwirtschaft. Über 20% des Ackerlandes leiden unter zu hohen Salzkonzentrationen. Große Mengen von Salzionen sind für die Pflanze toxisch, da sie die Enzymfunktionen hemmen können [343].

In einer Versuchsreihe mit verschiedenen Konzentrationen wurden Pflanzen mit NaCl in verschiedenen Konzentrationen zwischen 75mM-400mM behandelt. Abbildung 3.3 zeigt die Effekte verschiedener NaCl-Konzentrationen im Wachstumsmedium auf 14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen zwei Tage nach Stressbeginn. Bei niedriger Konzentration wurden keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen beobachtet. Bei Konzentrationen über 200mM weisen die Pflanzen hingegen deutliche Schäden auf. Die Blätter sind stark gebleicht und die Pflanzen weisen eine Chlorosis im fortgeschrittenen Zustand auf. Der Stresslevel ist so stark, dass die Pflanze aufgrund der Behandlung nicht mehr überleben kann. Die Behandlung mit Konzentrationen über 200mM zerstört den pflanzlichen Wasserhaushalt und das Ionengleichgewicht [229, 349], sowohl auf zellulärer als auch auf pflanzlicher Ebene. Die hohe Salzkonzentration führt zu molekularen Schäden, einer Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und bei höheren Konzentrationen auch zum Zelltod. Aus diesem Grund wurde eine etwas niedrigere Salzkonzentration von 150mM für die weiteren Analysen gewählt.

3.1.6 Die Induktion von oxidativem Stress mittels Paraquat

Für die Induktion des oxidativen Stresses wurde das chemische Kontaktherbizid Paraquat verwendet. Nach der Aufnahme in die Pflanze nehmen die Paraquat-Kationen im Chloroplast Elektronen vom PS-I auf, wodurch das Molekül zum Paraquat-Radikal wird. Überschüssige Elektronen werden anschließend an Sauerstoffmoleküle abgegeben. Paraquat indiziert die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies wie z.B. Superoxiden (O_2^-). Der phytotoxische Effekt findet in der Elektronentransportkette des Photosystems I (PS-I) statt [137] und setzt sich so lange fort, bis das PS-I komplett zerstört ist. Die Zellmembran wird porös und die Pflanze verliert Wasser. Das Resultat ist die Austrocknung der Pflanze innerhalb weniger Stunden [17]. Die richtige Konzentration von Paraquat darf eine sichtbare phänotypische Reaktion hervorrufen, ohne letal zu wirken.

In Abbildung 3.4.B werden die phänotypischen Veränderungen der Behandlungsreihe mit verschiedenen Paraquat-Konzentrationen dargestellt. Behandlungen in niedrigen Konzentrationen zeigen keine stressbedingten Symptome. In der Behandlung mit Konzentrationen über 5g/ha können zwei Tage nach Stressbeginn Veränderungen festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Die Pflanze kann sich vom Stress nicht mehr erholen. Aufgrund der Ergebnisse des phänotypologischen Vergleiches der unterschiedlichen Konzentrationen wurde für die weiteren Analysen eine Konzentration von 5g/ha ausgewählt.

3.1.7 UV-B Stress

Das Sonnenlicht enthält UV-Strahlung als Beiprodukt, was eine potenzielle Gefahr für die Pflanzen darstellt. Der UV-Stress wird in der Zukunft durch die Erschöpfung des Ozons weiter steigen. Die Lichtabsorption von UV-Strahlen kann zu weitreichenden Schäden auf molekularer Ebene führen. DNA- und RNA-Sequenzen können durch UV-Strahlen mutiert, Proteine und Lipide zerstört werden [298, 320].

Für die phänotypische Bestimmung des UV-Stresses wurden die Pflanzen für unterschiedliche Dauer mit UV-Licht bestrahlt. Es sollte herausgefunden werden, wie lang die Stressperiode sein kann, bis die Pflanzen den Schwellenwert für eine mögliche Regenerierung überschreiten.

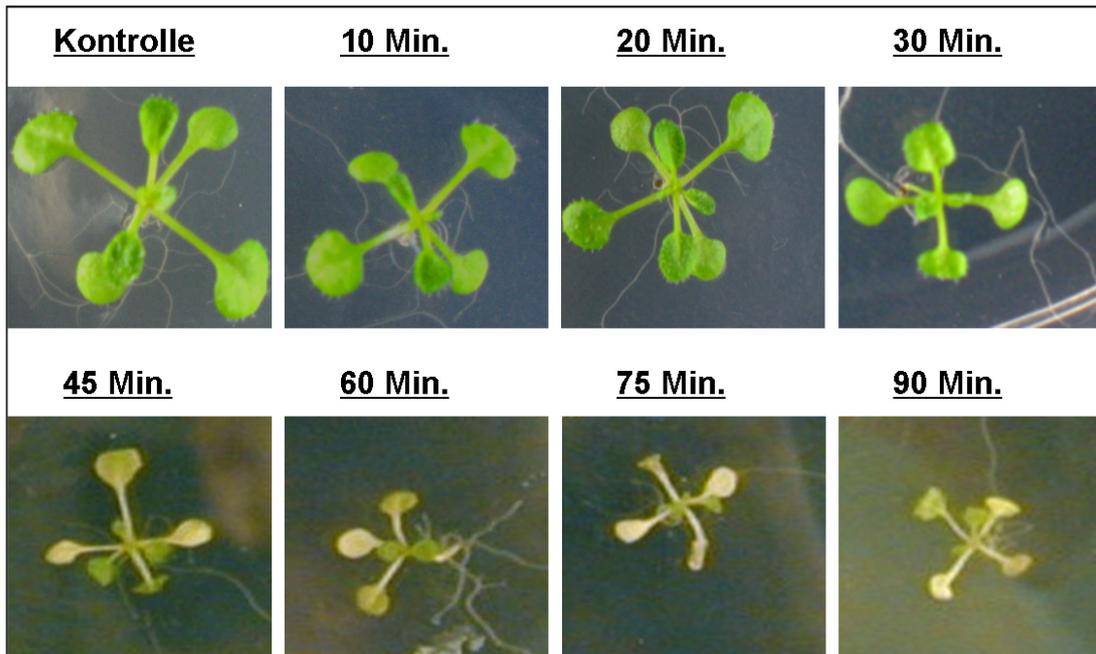
Abbildung 3.4.A zeigt den Phänotyp von 14 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen unter verschiedenen langen UV-Bestrahlungsperioden zwei Tage nach Stressende. Bei kürzeren Bestrahlungsperioden können leichte Stressmerkmale beobachtet werden. Die Wachstumsrate ist verlangsamt und die Blattstiele sind kürzer. Ab 45 Minuten werden die Stresssymptome deutlicher. Die Bleaching Merkmale deuten auf das Einleiten des programmierten Zelltodes hin. Die zellulären Schäden werden immer immenser. Der oxidative Stress ist durch die Freisetzung von ROS-Elementen zu stark.

Dementsprechend wurde eine Bestrahlungsperiode von 30 Minuten für diese Arbeit definiert. Die phänotypischen Symptome ähneln den Stressreaktionen, welche für die anderen Stressfaktoren gewählt wurden.

3.2 Die Qualitätsanalysen der technischen Daten

Für die Analyse der differentiellen Expression wurden Chips für jeden Stressfaktor angesetzt, wobei für jeden Stressfaktor mehrere Expositionsdauerexperimente durchgeführt wurden. In Tabelle 3.2 wird die Anzahl der Arrays für jeden Stressfaktor gezeigt. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der durch die Qualitätsanalysen verworfenen Chips wieder.

A. UV-Licht Stress



B. Paraquat Behandlung

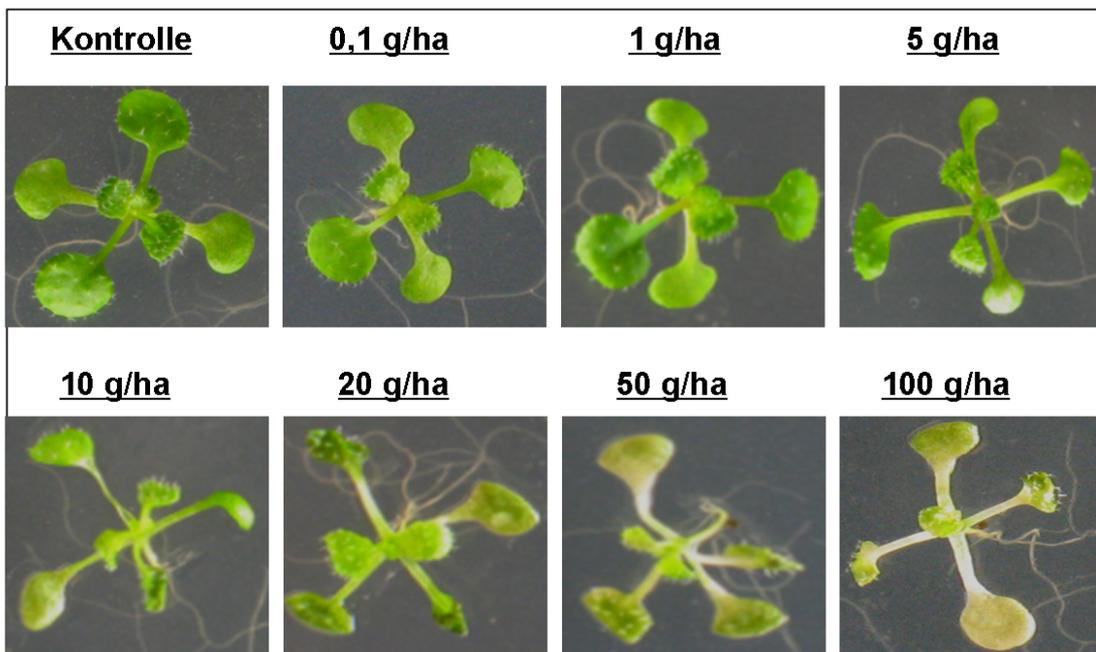


Abbildung 3.4: Bestimmung der Bedingungen bei UV-Stress und Behandlung mit Paraquat. 14 Tage alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit UV-Licht für verschiedene Perioden bestrahlt (A) oder mit Paraquat in verschiedenen Konzentrationen behandelt (B). Die phänotypischen Symptome werden mit steigender Stressintensität immer deutlicher. Das Wachstum wird verlangsamt und die Pflanzen werden heller. Die nekrotischen Merkmale deuten auf die Einleitung des programmierten Zelltodes hin.

Stressfaktor	Chips	1h		3h		6h		9h		24h		48h	
		ctrl	Behd	ctrl	Behd	ctrl	Behd	ctrl	Behd	ctrl	Behd	ctrl	Behd
Kälte	50 (5)	4	4	5	5	4	4	4(3)	5 (1)	4	4	4	3 (1)
Trockenheit	24	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Hitze	51 (3)	4	4	6 (1)	7	6	5 (1)	3 (1)	4	4	4	4	4
Lichtstress	56 (2)	3 (1)	4	6	5 (1)	5	5	5	5	5	5	4	4
Paraquat	33 (5)	0	0	3	3	3	4	4 (1)	4 (1)	3 (3)	3	3	3
Salzstress	27 (1)	2	2	2	2	2	2	4	3 (1)	2	2	2	2
Transfer	46 (2)	4	4	4	4	4	3 (1)	4	4	4	4	4	3 (1)
UV-Stress	28 (2)	2	2	2	2	2	2	3 (1)	3 (1)	2	2	4	2

Tabelle 3.2: Anzahl der Chips pro Stressfaktor und Zeitpunkt. Getrennte Kontrollproben wurden für jeden Zeitpunkt analysiert. Dadurch konnten differentielle Expressionswerte aufgrund des circadianischen Rhythmus genauso ausgeschlossen werden, wie Varianzen in der Aufbereitung der RNA. Die Zahlen in den Klammern geben die Chipsanzahl in jedem Stressfaktor an, welche aufgrund der technischen Qualitätskontrolle aus den weiteren Analysen entfernt wurden. Im folgenden Kapitel werden einige Qualitätskontrollen dargestellt.

Damit die verschiedenen Experimente miteinander verglichen werden können, musste deren Gesamtqualität analysiert werden. Die qualitative Analyse bestand aus drei Teilen. Als erster Schritt wurde jedes Array mit Hilfe der Affymetrix-internen Software (GeneChip Operating System, GCOS) gescannt. Das Arraybild wurde untersucht und die Qualitätsparameter für eine erfolgreiche Durchführung der Experimente bestimmt. Anschließend wurden die Arrays im *Refiner*[®]-Modul normalisiert und unterschiedlichen Qualitätskontrollen unterzogen. Im letzten Teil wurde das 'R'-Softwarepaket verwendet, um die qualitativ unzureichenden Experimente zu identifizieren und von weiteren Analysen auszuschließen. Hierzu wurden die Pakete Affy (V. 1.24.2), simpleaffy (V. 2.22.0) und AffyQ-Report (1.24.0) verwendet. Folgende Parameter wurden für die Analyse betrachtet: Ähnlichkeit innerhalb des Arrays, Anzahl der identifizierten Proben auf dem Array, Hintergrundrauschen, der Erfolg bzw. die Genauigkeit der Hybridisierung, die Qualität der cRNA-Proben, die Einheitlichkeit der Resultate und die Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimente unter unterschiedlichen Stressfaktoren (Tab. 3.3). Die Ergebnisse für die Arrays, die aus weiteren Analysen verworfen wurden, sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

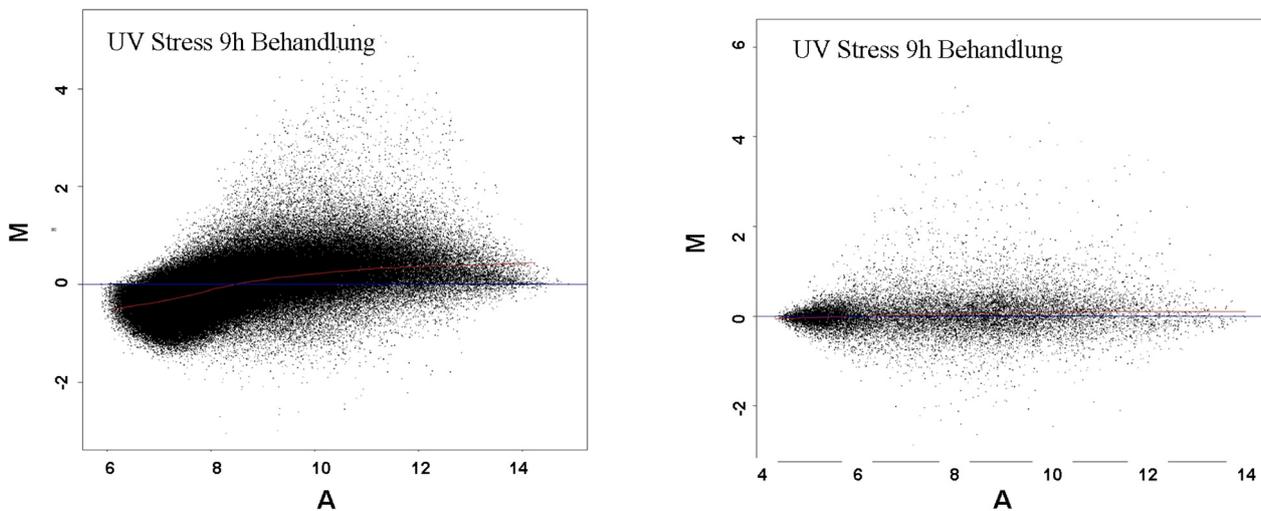
Analyse	Parameter	Beschreibung	Markierte Experimente
Ähnlichkeitsfaktor	idealer Wert liegt bei 1.0	Mittlere Arrayintensität des kompletten Datensatzes	Kälte 48h, Hitze 3h
Hintergrundrauschen	gut ≤ 80 \leq mittel ≤ 120 \leq schlecht	Analyse der Verunreinigungen in der Probe	chem. Stress 24h
Maskierte Bereiche	gut $\leq 0,2$ \leq mittel $\leq 0,5$ \leq schlecht	Bereiche mit einer ungewöhnlich hohen bzw. niedrigen Intensitätsstärke werden maskiert	Licht 3h
Corner noise	gut $\leq 0,015$ \leq mittel $\leq 0,02$ \leq schlecht	Variationen in der Signalstärke der Kontrollproben in den Chipecken werden gemessen	Transfer 6h, 48h
3'/5' Mean	gut $\leq 2,5$ \leq mittel $\leq 3,5$ \leq schlecht	Diese Werte werden über die Gene der Haushaltsgene bzw. hinzugefügte Spikes errechnet.	Hitze 9h, Transfer 6h
Gradientenverteilung	gut $\leq 0,12$ \leq mittel $\leq 0,165$ \leq schlecht	Die stark- und schwach-exprimierten Proben sollen im Array gleich verteilt sein. Bereiche mit einem überdurchschnittlichen Hintergrundrauschen werden markiert	Kälte 1 48h
Kurvenverformung	gut $\leq 0,16$ \leq mittel $\leq 0,2$ \leq schlecht	Der direkte Vergleich zwischen dem Array und dem Referenzexperiment der Gruppe	Hitze 1,2 48h
Klassifizierung	gut/mittel/schlecht	Ergebnis der Gesamtqualität der Chips	

Tabelle 3.3: Qualitätsanalyse mittels Affymetrix-Software. Diese Methoden wurden bei den Qualitätsanalysen der Experimente in der *Expressionist*[®]-Software angewandt. Die Parameterangabe wird in Prozent der gesamten Chipoberfläche bzw. in deren Intensität gemessen. Zu hohe Werte deuten auf eine ungewöhnliche Expressionsintensitätsverteilung hin und bedürfen weiterer Analysen.

Ein Grund für die Unterschiede in der Chipqualität kann zum Beispiel in Abweichungen der Bedingungen während der Aufarbeitung oder des Scannens liegen. Mit dem GCOS-Programm kann die Image-Datei (*.DAT File) der Chips begutachtet werden und einen ersten Eindruck über die Qualität des Chips liefern. Für jeden Chip wurden Reports-Files erstellt. In diesen wurden Angaben über den Erfolg der Hybridisierung gespeichert. Hierzu wurde auf bestimmte Werte besondere Augenmerk gelegt. Der Ähnlichkeitsfaktor trifft Aussagen über die mittleren Arrayintensitäten. Der ideale Wert liegt bei ca. 1.0. Ein Faktor ≥ 3.0 weist zu große Variationen innerhalb eines Experiment-Sets auf und muss mit Vorsicht behandelt werden. Das Experiment unter Kältebedingungen nach 48h weist eine mittlere Intensität von über 115 auf. Eine zu hohe RNA-Konzentration in der Probe könnte eine solche Intensitätserhöhung verursachen. Aufgrund dieser Tatsache kann dieses Experiment mit den restlichen abiotischen Stressfaktoren in diesem Datensatz nicht verglichen werden. Das Experiment wurde daher aus folgenden Analysen entfernt (Tab. 3.10). Die prozentuale Angabe (% Vorhanden) beantwortet die Frage, wie viele Gene aus dem kompletten Datensatz auf dem Array nach der Hybridisierung identifiziert wurden. Ein niedriger Wert deutet auf unvollständige Hybridisierung hin. Die Transferexperimente nach 6h bzw. 48h oder Kälte nach 48h sind einige der Experimente mit sehr geringer prozentualer Anwesenheit (Tab. 3.10). Es ist nicht möglich, diese Arrays mit den anderen zu vergleichen, da die Werte für die entsprechenden Gene fehlen. Aus diesem Grund wurden Experimente mit solchen geringen prozentualen Werten aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Der Wert des Hintergrundrauschens deutet auf Verunreinigungen hin, die auf eine unspezifische Art binden können und die Expressionsintensität der eigentlichen Proben verfälschen. Das Lichtstressexperiment nach 3h weist, im Vergleich zu den anderen Arrays, ein erhöhtes Hintergrundrauschen auf. Die Konzentration an Verunreinigungen in der Probe ist zu hoch. Diese Probe ist mit den anderen Arrays nicht mehr vergleichbar. Dieses Array, sowie solche mit einem ähnlichen Verhalten, wurden verworfen (Tab. 3.10).

Eine qualitativ gute 3'-5' GAPDH- und β -Actin-Ratio besagt eine vollständige und effiziente cDNA-Synthese bzw. In-Vitro Transkription (IVT). Wie aus Tabelle 3.10 ersichtlich ist, weisen mehrere der aus dieser Analyse verworfenen Experimente schlechte 3'-5'-Verhältnisse sowohl für die GAPDH als auch für β -Actin auf. Zwei Experimente des Kältestresses zeigen ein 4.5-faches Verhältnis. Mögliche Ursache für diese Werte könnten unvollständige RNA-Sequenzen sein. Diese könnten durch eine fehlerhafte cDNA-Synthese oder (c)RNA-Degradation entstanden sein. Ein Hitzestressarray nach 6h sowie ein Lichtstressexperiment nach 3h stellen ein umgekehrtes Bild dar. Hier wurde das 5'-Sequenzende viel intensiver identifiziert. Unspezifisches Binden der Probesequenzen an deren Gegenproben auf dem Array ist möglicherweise die Ursache für diese Werte. Bei solchen Werten sind diese Arrays nicht mit dem restlichen experimentellen Datensatz vergleichbar. Aus diesem Grund wurden diese Experimente ebenfalls aus der Analyse genommen.

In Abbildung 3.5 wird das Expressionsverhalten eines UV-behandelten Experimentes nach 9h dargestellt. Die beiden Plots zeigen die Veränderungen in der Expressionsintensität vor und nach der Normalisierung wieder. Diese Gegenüberstellung in den MA-Plots (M: Intensitätsratio der Gene; A: mittlere Intensität eines Gens) verdeutlicht, wie durch die Normalisierung die Vergleichbarkeit der Arrays verbessert wird. Mit dem MA-Plot können statistisch signifikante Intensitätsschwankungen in einem Array im Vergleich zum restlichen Datensatz repräsentiert werden. Die Rohdaten, wie z.B. die in Abb. 3.5.a, zeigen einen kurvenförmigen Verlauf. Diese Struktur deutet auf einen Intensitätsbias hin, der durch die Normalisierung korrigiert werden kann (Abb. 3.5.b). Der MA-Plot stellt den Einfluss des Intensitätsbias auf die Interpretation der Expressionswerte dar. Die Normalisierung entfernt solche systematische Fehler. Wenn keine Intensitätsschwankungen vorkommen, muss die Punktwolke



(a) Die Intensitätsverteilung der Rohdaten

(b) Expressionsverteilung der normalisierten Daten

Abbildung 3.5: MA-Plot vor und nach der RMA-Normalisierung eines UV-Experimentes nach 9h. Die MA-Plots zeigen die Veränderung der Streuung in der Punktwolke der Expressionswerte aufgrund der Normalisierung. Beim direkten Vergleich zweier Experimente wurden die Expressionswerte in der Punktwolke aufgrund der Normalisierung in die Mitte geschoben. M: Intensitätsratio der Gene; A: mittlere Intensität eines Gens

gegen Null (die Horizontale) streuen (Abb. 3.5.b).

Qualitätsanalyse mittels Expressionist[®]. Im zweiten Schritt der Qualitätsanalyse wurden die Experimente mit Hilfe der Refiner bzw. Analyst untersucht. Tabelle 3.3 gibt eine Zusammenfassung über einige der Qualitätsanalysen mit den entsprechenden Parametern aus dem Refiner-Modul wieder. In der Analyse mittels Refiner wurden Bereiche mit zu hohen Intensitätsschwankung im Vergleich zum restlichen Array maskiert. Dadurch wurde vermieden, dass kleine fehlerhafte Bereiche die Gesamtqualität des Experiments verfälschen. Wenn der prozentuale Bereich dieser Maske dem Anteil von 0,5% der Gesamtfläche übersteigt, wird das Array als „schlecht“ qualifiziert. Bei den Transferexperimenten nach 6h sowie nach 48h (Tab. 3.10) wurde über 0,5% der Chipoberfläche maskiert. Die Qualität dieser Arrays wurde aus diesem Grund als „schlecht“ gekennzeichnet. Die Proben in den Arrayecken dienen als Kontrolle der Hybridisierungsprozesse. Zu hohe Werte in diesen Bereichen deuten auf mögliche Fehler in der Hybridisierung hin (Unvollständigkeit, unterschiedliche RNA-Konzentrationen usw.). Wie in Tabelle 3.10 dargestellt ist, führten Werte über 0,02% zur Herabstufung der Arrayqualität (Tab. 3.3). Das Lichtstressexperiment nach 3h weist einen extrem hohen Wert von über 7% auf, was zu einer überdurchschnittlich schlechten Gesamtqualität beiträgt. Das 3'-5'-Verhältnis für die Haushaltsgene mit einer konstanten Expression sowie die in einer bekannten Konzentration hinzugefügten Spikes wurden gemessen. Eine gleichmäßige Ratioverteilung dieser Gene in alle Experimenten eines Datensets deutet auf eine erfolgreiche Hybridisierung und vergleichbare Grundbedingungen für die Analyse hin. Das Hitzestressexperiment nach 9h sowie das Transferstressexperiment nach 6h weisen ein ungewöhnlich hohes Verhältnis auf. Solche Werte deuten auf eine mögliche zu hohe RNA-Konzentration hin, die bei der Hybridisierung aufgetragen wurde. Aus diesen Gründen können solche Arrays nicht mit dem restlichen Datensatz verglichen werden und aus den weiteren Analysen entfernt.

Anschließend wurden die Experimente im Analyst weiteren Analysen unterzogen. Hier wurde die Verteilung der Expressionswerte begutachtet und das Verhalten der einzelnen Chips zueinander analysiert. Abbildung 3.6 zeigt ein Beispiel für den Vergleich der Expressionsintensitäten zweier Ex-

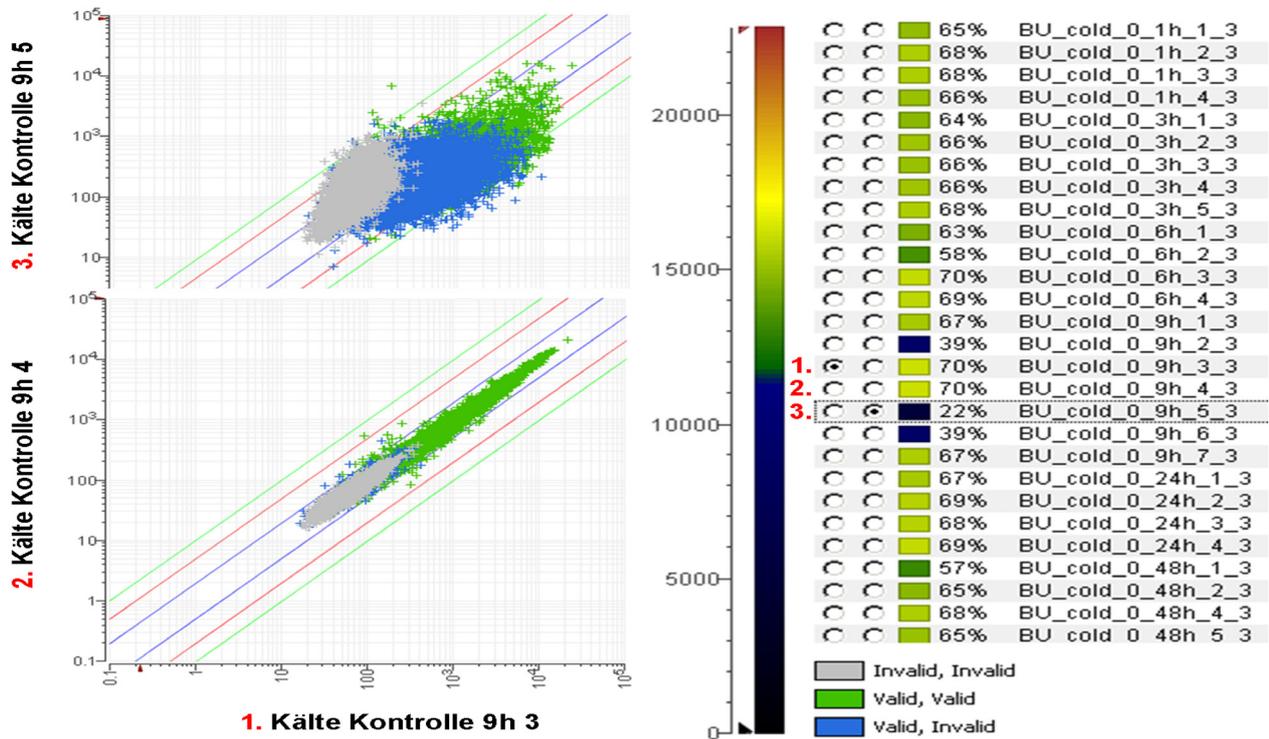


Abbildung 3.6: Der Qualitätsvergleich der einzelnen Chips im Log-log Plot. Niedrige Korrelationen zwischen zwei Chips deuten auf Anomalien im Expressionsverhalten hin. Sowohl biologische (unterschiedliche RNA-Mengen) als auch technische Gründe (defekte Chips, fehlerhafte Hybridisierung) können dieses Verhalten erklären. Eine Methode, solche Abweichungen zu detektieren, liefert der Log-Log Plot. Auf der linken Seite wird der Vergleich der Microarrays aus der Kältestress-Serie in einem Zeitpunkt (9 Stunden) miteinander dargestellt. Rechts werden alle Chips mit deren prozentualen Qualitätsangaben aufgelistet. Die blauen Chips weisen eine sehr niedrige Korrelation zu den anderen Arrays auf. Der Vergleich der zwei Kontrollexperimente mit den Replikaten 3 (22%) und 5 (70%) auf der linken Seite verdeutlicht das Ziel der Qualitätsanalyse. Im Idealfall müssen sich alle Punkte innerhalb der beiden blauen Linien aufhalten. Alles was darüber hinaus geht weist eine Foldinduktion von über 2 auf. Dies sollte bei Arrays derselben Behandlung nicht stattfinden. Wenn die Expression stark abweicht, werden die Chips von weiteren Analysen entfernt.

perimente. Die Prozentangaben auf der rechten Seite geben an, wie viele Proben in den jeweiligen Chips als vorhanden bzw. nicht vorhanden klassifiziert wurden. Beim Vergleich der logarithmischen Expressionswerte verschiedener Replikas wurden auf diesem Wege Artefakte identifiziert. Beim Vergleich zweier Experimente soll die Punktwolke als eine Linie in der Plotmitte liegen. Abbildung 3.6 zeigt ein Beispiel für den Vergleich verschiedener Experimente miteinander. Replikas 3 und 4 zeigen eine große Übereinstimmung während 3 mit 5 eine Verformung der logarithmischen Kurve aufweisen. Der Grund dafür ist die sehr niedrige Prozentangabe der gefundenen Proben im Experiment Nr. 5 (lediglich 22%). Der Vergleich dieses Arrays mit dem restlichen Datensatz würde zur einseitigen Verformung des Gesamtbildes führen. Fehlende Werte verfälschen die Berechnung der Intensität dieser Gene in der Versuchsreihe. Aus diesem Grund wurden Arrays wie das Experiment Nummer 3 in Abbildung 3.6 ausgesondert.

Für die Qualitätsanalyse der Microarrays wurden weitere Analysen im Analyst durchgeführt. Boxplots vergleichen die Verteilung der Expressionswerte aller Experimente. Ausreißer bzw. Verschiebungen der Boxen deuten auf Probleme in der Normalisierung der Daten hin [318]. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) dient der Reduktion und Visualisierung multivarianter Datensätze [192, 7]. Mit Hilfe der PCA können Beziehungen zwischen Experimenten identifiziert werden. Sie hilft bei der Analyse und dem Entfernen von Ausreißern, die für bestimmte Veränderungen bei der Projektion der Experimente zuständig sind. Während der Boxplot die Expressionsverteilung innerhalb des Arrays abbildet, wird das Gesamtbild aller Experimente mit Hilfe einer PCA dargestellt. Das Experiment

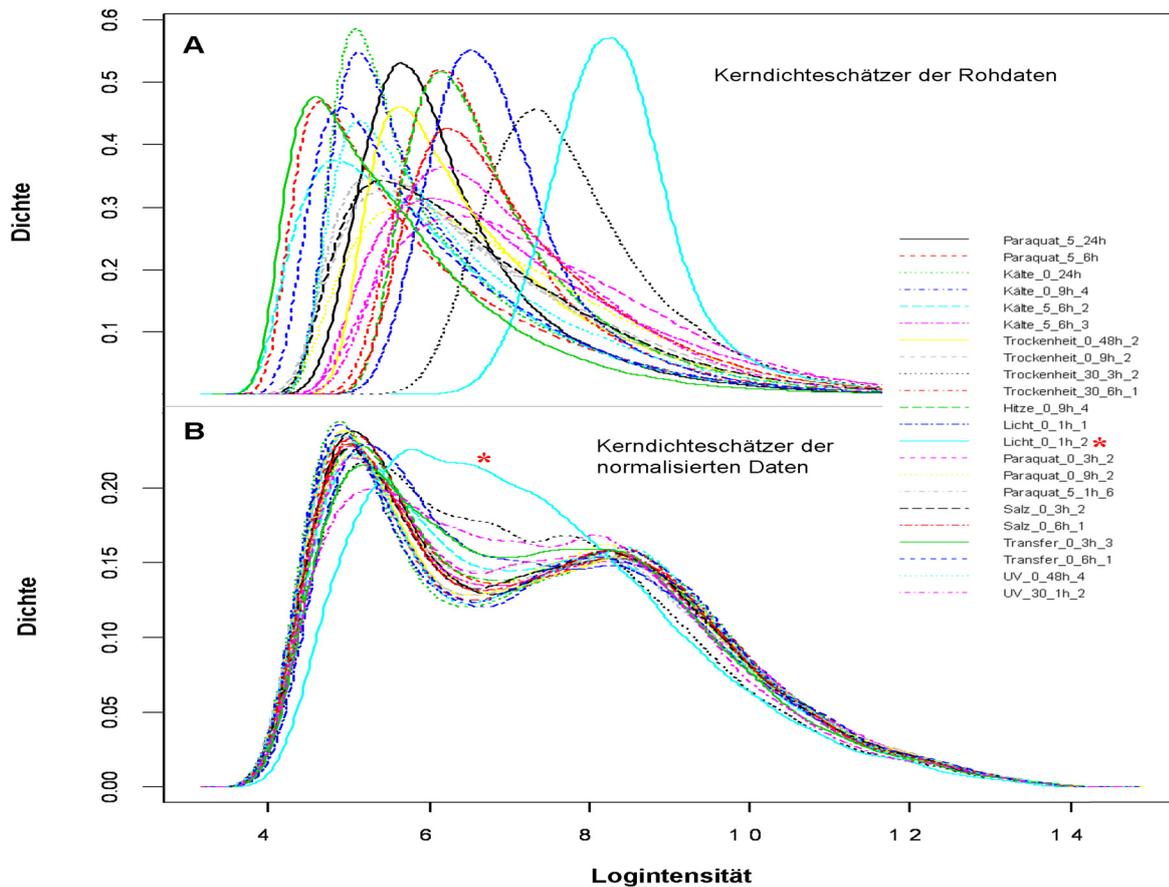


Abbildung 3.7: Die Dichteverteilung der PM-Intensitäten dient dem Vergleich der Expressionsverteilung aller Experimente in einem Datenset. Die unterschiedlichen Experimente verursachen vor der Normalisierung eine breitere Streuung der Expressionsintensitäten (oben). Durch die RMA-Normalisierung wurde die Verteilung der einzelnen Arrays auf einer Linie vereinheitlicht (unten), wodurch sie vergleichbar wurden. Das mit einem Sternchen markierte Experiment weist nach der Normalisierung eine abweichende Intensitätsverteilung der PM-Werte auf. Dieses Experiment wurde aus der Analyse ausgeschlossen.

mit chemischen Stress nach 24h bzw. Kältestressexperiment nach 9h, um nur einige zu nennen, zeigen ein auffälliges Verhalten. Viele Ausreißer in diesem Experiment führen dazu, dass die PCA bzw. Boxplotanalyse sie als „qualitativ schlecht“ gekennzeichnet haben. Diese Arrays müssen mit Vorsicht betrachtet werden, bevor sie in die Analyse aufgenommen werden.

Qualitätsanalyse mittels R-Software. Der dritte Schritt der Qualitätsanalyse der technischen Daten wurde mittels der Statistik-Software 'R' durchgeführt [83, 129, 341, 240]. In der Kerndichteschätzer-Analyse [240, 241] wurde die Verteilung der logarithmierten Intensitätswerte der PM-Proben (Perfect Match, vollständige Übereinstimmung) auf dem Array abgebildet (Abb. 3.7). Je höher und schmaler die Kurve ist, desto höher ist die Auflösung der Expressionswerte. Im Idealfall wären alle Kurven gleich hoch und breit und würden übereinander liegen. Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, liegt die Streuung der Rohdaten (oben) größer als die der normalisierten Daten (unten). Das Lichtstressexperiment nach 1h fällt aus der Norm aus. Dieses Array wurde aus den weiteren Analysen ausgefiltert.

Eine weitere Qualitätsanalyse stellt das QC-Diagramm dar (Quality Control, Abb. 3.8). Hier wurden verschiedene Qualitätsparameter zusammengefasst abgebildet. Mit Hilfe dieser Darstellung wurde die Analyse von Ausreißern vereinfacht. Im ersten Teil der QC-Analyse (3.8.A, % present call) wurde für jedes Array die Anzahl der Gene errechnet, welche als anwesend gekennzeichnet wurden.

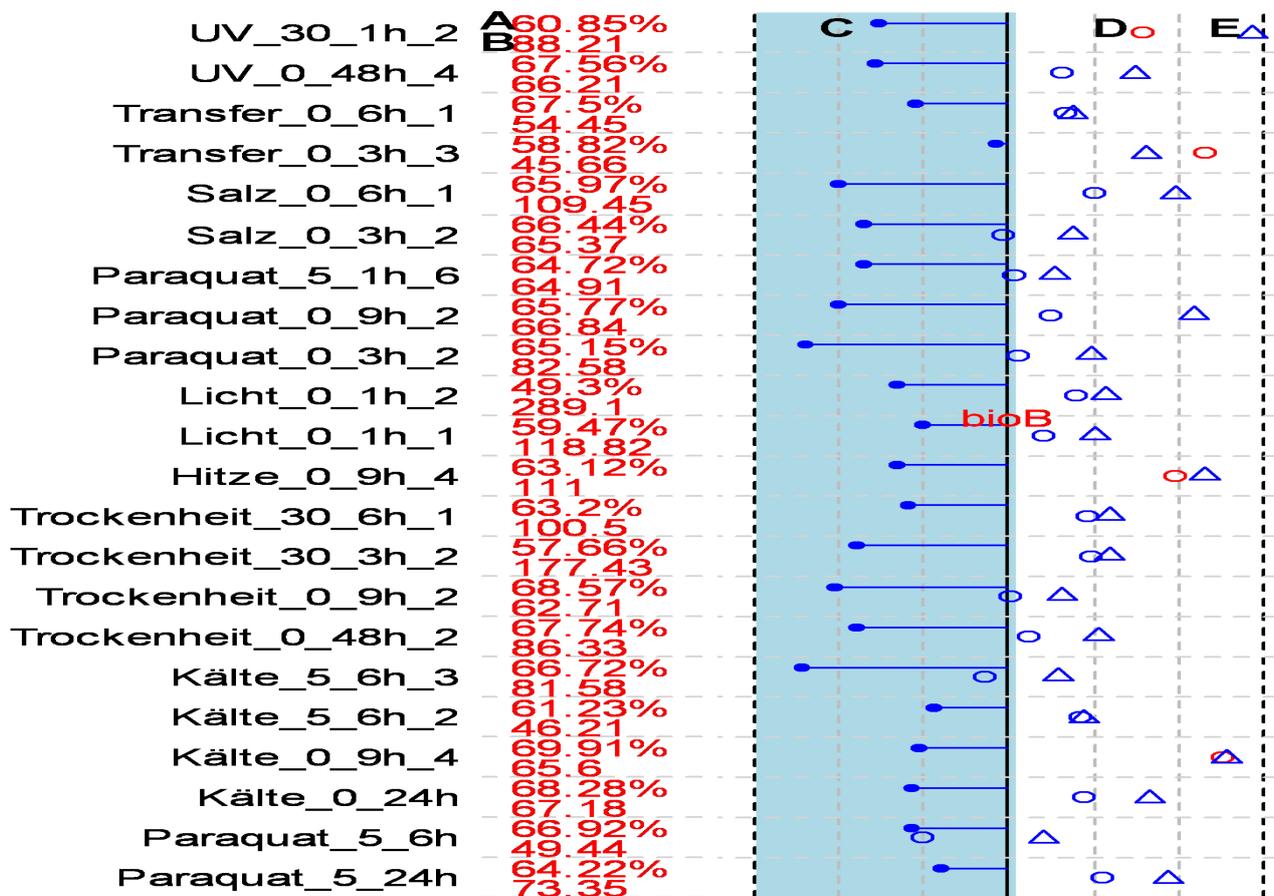


Abbildung 3.8: 3'-5' Verhältnis der Kontrollgene auf dem Chip. Jede Zeile repräsentiert ein Array, wobei der obere Wert den prozentualen Anteil der als vorhanden gekennzeichneten Gene (A) und der untere den als Hintergrundrauschen (B) wiedergeben. Die roten Zahlen deuten auf eine Differenz über 10% in der Anzahl der gefundenen Gene oder das Hintergrundrauschen ist zu hoch relativ zu %-Present. Die blauen Linien geben den Skalierungsfaktor für die einzelnen Arrays im Vergleich zu der allgemeinen mittleren Arrayintensität wieder (C). Skalierungswerte unter 3-fach der mittleren Intensität werden für eine erfolgreiche Analyse benötigt und werden blau markiert. Die Kreise und Dreiecke zeigen das 3'-5' Verhältnis der GAPDH (D) bzw. β -Actin (E) in den entsprechenden Arrays. Diese Haushaltsgene werden stressunabhängig exprimiert. Die 3'-5' Ratio ist ein Signal für eine gelungene Hybridisierung. Eine Ratio über 1.25-fach für GAPDH oder über 3-fach für β -Actin wurde rot gefärbt. Diese Werte deuten auf mögliche Probleme bei der Aufbereitung.

Die rote Farbe deutet darauf hin, dass die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Experimenten in diesem Vergleich „größer als 10%“ beträgt. Für das Lichtexperiment nach 1h (Replika 2) wurden unter 50% der Proben im Array als Anwesend klassifiziert. Dies bedeutet, dass die Hälfte der Proben auf dem Array eine zu schwache Expressionsintensität aufweisen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der restlichen Qualitätsanalysen wurde dieses Array aus den Analysen verworfen (Tab. 3.10). Die Ergebnisse dieser Analyse sollten zusammen mit denen der mittleren Hintergrundwerte betrachtet werden (Abb. 3.8.B). Hohes Hintergrundrauschen deutet auf mögliche Probleme während der Hybridisierung hin. Dasselbe Lichtexperiment nach 1h zeigt einen starken Hintergrund. Dies dient als weiterer Beweis für die geringe Qualität dieses Experimentes. Die nächsten drei Faktoren (Abb. 3.8.C der Skalierungsfaktor, GAPDH (3.8.D) sowie β -Actin (3.8.E)) zeigen die Expressionsintensität für die Spike-Ins bzw. die Haushaltsgene auf dem Array. Der Skalierungsfaktor repräsentiert den mittleren Bereich der Expressionsintensitäten dieser Gene. Rot markierte Experimente stellen Arrays mit einem erhöhten Wert dar, was auf einen möglichen Fehler im Hybridisierungsprozess hindeutet. Die 3'-5' Ratio von GAPDH und β -Actin sollte laut Affymetrix unter 1,25 bzw. unter 3 liegen [5]. Werte außerhalb dieses gewünschten Bereiches (in Abb. 3.8 rot markiert) deuten auf mögliche Störungen

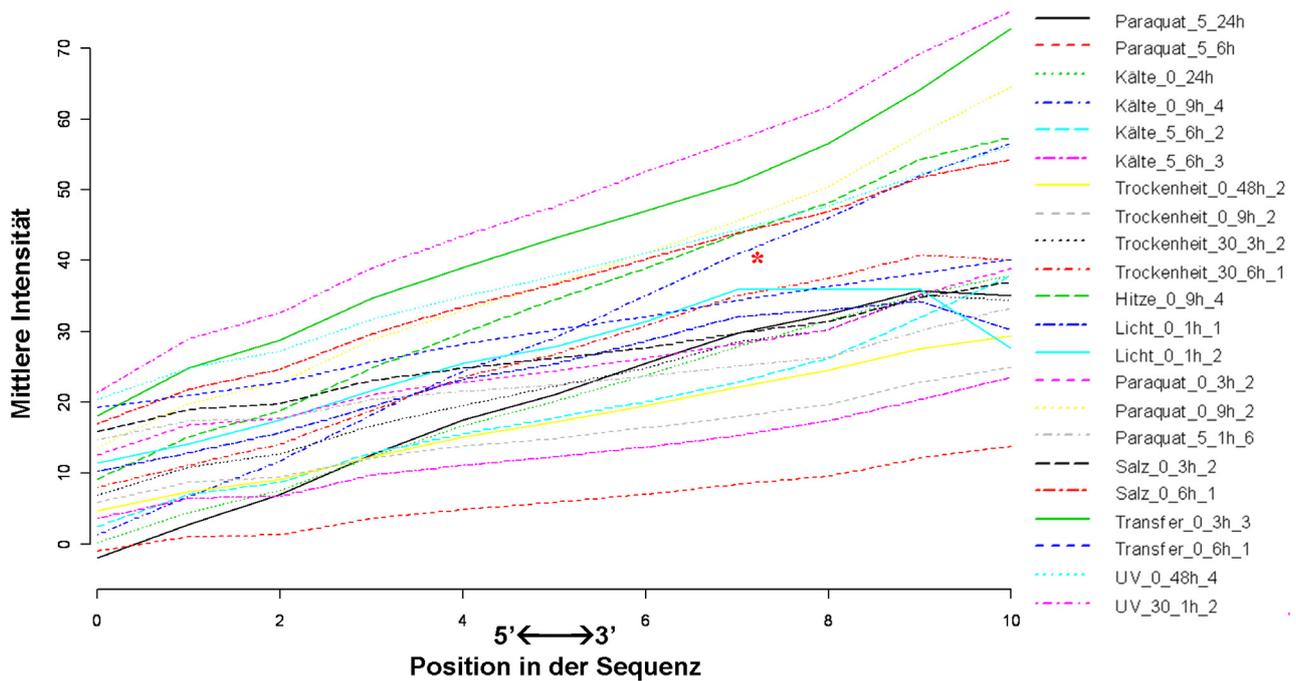


Abbildung 3.9: Die RNA-Degradationskurve. Abgebildet wurden die positionsabhängigen mittleren Expressionsintensitäten der einzelnen Arrays im Vergleich zur gesamten mittleren Intensität in den Sequenzen in Richtung 5'→3'. Die Steigung der Kurve zeigt das Verhältnis der Expressionsintensitäten zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende. Eine steile Kurve deutet somit auf eine unvollständige Hybridisierung hin. Das mit einem Sternchen markierte Experiment unter Kältebedingungen nach 9h weist ein Verhältnis 6,44 auf (Tab. 3.10). Aufgrund dieses Wertes, sowie der Resultate weiterer Qualitätsanalysen wurde dieses Experiment entfernt.

im Aufbereitungsprozess der Proben, wie z.B. RNA Degradation oder Fehler in der Hybridisierung hin. Zusammen mit weiteren Resultaten wurde das Hitzestressexperiment nach 9h aus diesem Grund aus weiteren Analysen entfernt.

Mit der RNA-Degradationskurve in Abb. 3.9 wird die nächste Qualitätsanalyse der Hybridisierung abgebildet. Die Proben im Probeset werden nach deren Nähe zum 5'-Ende des Zielmoleküls angeordnet [3]. In der Regel beginnt die RNA-Degradation am 5'-Ende des Moleküls. Es war deshalb zu erwarten, dass die Probenintensitäten in Richtung 3'-Ende sinken. In Abb. 3.9 wurden die mittleren Intensitäten entlang der 5'-3'-Sequenzpositionen geplottet. In dieser Analyse wird die Unvollständigkeit der RNA-Hybridisierung bzw. die Stärke des RNA-Abbaus untersucht. Hierbei müssen zwei Punkte beachtet werden. Die Steigung der Kurven für alle Experimente soll im optimalen Fall parallel verlaufen. Unterschiedliches Verhalten wird auf Differenzen in den Resultaten der Arrayhybridisierung zurückgeführt. Eine zu steile Steigung (i.d.R. über 5) deutet auf eine stärkere Degradation bestimmter Sequenzen hin. Dies verfälscht die Ergebnisse der Experimente [8].

In Tabelle 3.10 der verworfenen Experimente waren fünf Arrays mit einem Degradationswert von über 5 gemessen. Diese Experimente weisen zusätzlich hohe Ratioverhältnisse in den 3'-5'-GAPDH sowie den Mittelwerten der Haushaltsgene auf. Diese drei Faktoren zusammen deuten stark darauf hin, dass die RNA-Synthese nicht vollständig abgelaufen ist. Diese Degradationskurve der chemischen Stressexperimente nach 6h bzw. 24h ist ebenfalls in Abb. 3.9 dargestellt. Die Steigung dieser Experimente verläuft verhältnismäßig steiler als die Hauptgruppe der Experimente. Diese Arrays konnten deshalb nicht mit den restlichen unter gleichen Bedingungen analysiert werden. Sie wurden zusammen mit den anderen drei Experimenten mit auffällig hohen Degradationswerten aus weiteren Analysen entfernt.

Chip name	Ähnlichkeitsfaktor	% Vorhanden	mittlerer Hintergrund	GAPDH 3'/5'	βActin 3'/5'	BioB Signal	Degradation	controls	box plot	heatmap	Refiner	Masked Area (%)	Corner Noise	3'/5' Mean	PCA
Chem. Stress 24h 1	0.20	42.66	979.37	0.07	0.71	A	0.78					0.11	0.01	1.43	
Chem. Stress 24h 2	0.44	43.66	241.08	0.72	0.67	A	0.45					N/A	0.01	1.12	
Chem. Stress 6h 1	0.53	54.23	160.75	0.22	0.32	P	1.06					0.30	0.01	1.52	
Chem. Stress 6h 2	0.62	36.74	356.48	1.22	0.64	A	0.98					0.10	0.03	1.5	
Chem. Stress 9h	0.36	29.04	660.52	0.64	0.22	A	0.30					0.09	0.03	1.45	
Hitze 3h	9.34	14.46	35.51	2.21	0.21	P	0.10					N/A	0	1.54	
Hitze 6h	3.08	33.05	34.92	2.69	0.11	F	0.78					N/A	0	1.85	
Hitze 9h	0.89	58.10	95.82	3.21	2.93	P	6.12					0.01	0	4.31	
Kälte 48h	115.18	8.15	23.71	0.58	2.74	F	1.88					N/A	0	2.46	
Kälte 9h 1	2.39	37.52	44.54	4.51	2.07	P	6.44					0.03	0	3.19	
Kälte 9h 2	3.94	20.31	69.44	4.49	0.62	F	5.52					0.04	0	1.48	
Kälte 9h 3	3.00	37.58	55.61	3.48	2.20	F	6.78					0.02	0	3.25	
Kälte 9h 4	0.35	66.61	84.25	0.97	1.50	P	3.10					0.05	0	2.06	
Licht 1h	0.41	49.30	289.10	1.13	0.60	A	2.10					0.07	0	1.87	
Licht 3h	0.27	2.67	2156.35	1.29	0.11	A	0.19					N/A	7.17		
Salz 9h	0.30	59.00	219.82	0.58	0.13	F	1.24					0.01	0	1.35	
Transfer 48h	0.39	16.64	1320.21	0.17	0.22	A	0.02					0.57	0.07	1.07	
Transfer 6h 1	1.16	63.22	39.58	3.02	3.03	F	5.19					0.12	0	4.03	
Transfer 6h 2	0.35	6.71	2580.98	0.27	0.24	A	0.05					0.92	0.04	1.53	
UV 9h 1	0.33	46.28	285.67	1.44	0.80	P	1.62					N/A	0.01	1.92	
UV 9h 2	0.15	41.22	903.45	0.48	0.48	A	0.93					N/A	0.01	1.28	

Abbildung 3.10: Zusammenfassung der aus der Analyse entfernten Experimente. Die Tabelle listet die Microarrays mit einer zu schlechten Qualität auf. Diese Experimente wurden aufgrund verschiedener Parameter aus weiteren Analysen ausgeschlossen. Die rot markierten Zellen weisen Werte auf, die sich außerhalb des qualitativ akzeptablen Bereiches befinden.

Ein Experiment wurde nicht aufgrund einer einzigen Analyse aus dem Datensatz ausgefiltert. Jedes der Arrays, das in irgendeiner Analyse wegen der schlechten Qualität durchgefallen ist, wurde auch in den restlichen Analysen untersucht. Erst wenn Arrays bei mehreren Analysen schlechte Qualität aufwiesen, oder wenn die Werte in einzelnen Analysen Ausreißer gezeigt haben, wurden diese ausgefiltert. Ein Ausschnitt aus der gesamten Qualitätstabelle, in der die Ergebnisse der Qualitätsanalyse zusammengefasst werden, wird in Tabelle 3.10 abgebildet. Hier wurden die 21 Experimente, welche aufgrund unzureichender Qualität aus der Analyse ausgeschlossen worden sind, aufgelistet. Nachdem die Arrays mit unzureichender Qualität entfernt wurden, konnten die restlichen Arrays zu einem Datensatz zusammengefasst. In den folgenden Analysen wurden die Pflanzen auf stressbedingte signifikant differentiell regulierte Gene in den unterschiedlichen Stressfaktoren analysiert (Tab. 3.4).

3.3 Die Analyse differentiell-regulierter Gene anhand Genexpressionsprofile

Im Anschluss an die technische Qualitätsanalyse wurden die einzelnen Gruppen auf signifikant differentiell regulierte Gene mittels eines t-Tests, gekoppelt an eine Testkorrektur für die Analyse von multiplen Hypothesen nach Benjamini und Hochberg getestet [91, 26]. Als „signifikant dereguliert“ wurde ein Gen dann klassifiziert, wenn bei ihm eine relative Expression von mindestens zwei gemessen wurde. Die relative Expression eines Gens stellt das Verhältnis zwischen der Expressionsintensität des behandelten Gens zu dessen Kontrolle dar. Es zeigte sich, dass eine zweifache Expressionsintensität als Standardwert das beste Verhältnis bei der Identifizierung der falsch-positiven zu den wahrnegativen Treffern stellt. Mit diesem Wert konnten die meisten wahren signifikant differentiell regulierten Gene (sog. „true positives“) gefunden werden, während die Fehlerrate minimiert wurde [29]. Die Gene wurden für jeden Stressfaktor und Zeitpunkt in Gruppen der hoch- bzw. runterregulierten Gene unterteilt (Tab. 3.4).

Der zeitliche Verlauf der Genexpression weist für die verschiedenen Stressfaktoren unterschiedliche kinetische Verhaltensmuster auf (Abb. 3.11). Die Hitzestressantwort zeigt eine sehr intensive und schnelle Reaktion der Pflanzen. Es werden sehr viele Gene direkt bei Stressbeginn stark expri-

Stress	1h	3h	6h	9h	24h	48h
Kälte	49	286	652	723	949	996
	69	288	459	750	898	901
Trockenheit	29	85	178	154	133	24
	57	91	200	65	100	41
Hitze	691	780	944	1341	1220	1378
	957	1334	1740	1133	1435	1377
Licht	295	523	540	399	346	92
	177	333	338	259	304	148
Paraquat	0	782	558	419	318	557
	0	482	442	368	259	112
Salzstress	303	361	342	469	400	695
	29	109	101	263	354	357
Transfer	122	471	366	18	50	0
	9	43	152	4	19	1
UV-Stress	161	607	932	1172	496	876
	103	364	975	1502	518	839

Tabelle 3.4: Die Anzahl der zweifach differentiell regulierten Gene pro Stressfaktor und Zeitpunkt nach einem t-Test ($p=0.01$) gekoppelt an einer FDR-Testkorrektur für multiple Testhypothesen. Die hoch- (in rot) und die herabregulierte Gene (in grün) sind markiert. Hitzestress weist nach einer Stunde bereits sehr viele differentiell regulierte Gene auf. Die Anzahl der deregulierten Gene steigt hier kontinuierlich an. Dagegen zeigt die Reaktion auf Kälte und Trockenheit eine eher schwächere Reaktion. Das Wachstum in der Anzahl der Gene unter Kälte ändert sich stark gegen Ende, wobei die Anzahl bei Trockenstress bis zum Ende sehr niedrig bleibt. In den meisten Messungen wurden mehr herabregulierte als hochregulierte Gene gefunden.

miert. Bei Kälte- und Salzstressantwort steigt die Anzahl an deregulierten Genen kontinuierlich mit der Stressdauer an. Dagegen weisen Lichtstress und die Behandlung mit Paraquat ein Maximum nach sechs bzw. drei Stunden auf. Die Antwort auf Trockenheit beschränkt sich auf relativ wenige Gene. Die Trockenstressantwort erreicht ein Maximum bei 6h. Die relative Stressintensität des Trockenstresses ist jedoch viel intensiver als bei anderen Faktoren (Abb. 4.2 auf Seite 105). Trotz der transienten Behandlung weisen Pflanzen, die UV-Stress ausgesetzt wurden, eine kontinuierlich und schnell steigende Anzahl an signifikant deregulierten Genen auf.

Die unterschiedlichen Stressantworten deuten darauf hin, dass die Stressantwortkinetik von mehreren Faktoren beeinflusst wird. Beispiele hierfür sind die Dauer und Intensität des Stresses, die Stressart oder das experimentelle Design. Der Vergleich dieser Daten mit anderen Experimenten (AtGenExpress¹) hat gezeigt, dass die Stressbedingungen oder unterschiedliche experimentelle Designs einen starken Einfluss auf die Kinetik der Stressantwort sowie auf die Anzahl und Funktion der deregulierten Gene ausüben (Abb. 3.11) [148, 337, 189, 357]). Wie bereits vorher erwähnt wurde, würden drei der sieben untersuchten Faktoren (Hitze, Trockenheit, UV-Licht) aufgrund ihres starken Einflusses auf den Ertrag für die weiterführenden Analysen gewählt. In den kommenden Abschnitten wird der Einfluss dieser Stressfaktoren auf die Pflanze ausführlich analysiert.

3.3.1 Die Reaktion der Pflanze auf Hitzestress

Die Expression von Hitzestress-regulierten Biomarkern Hohe Temperaturen stellen einen zentralen Stressfaktor in der Pflanzenwelt dar. Pflanzen als sessile Organismen müssen Methoden entwickeln, um sich Temperaturveränderungen anzupassen. Steigende Temperaturen üben einen negativen Effekt auf die pflanzliche Wachstumsrate aus (Abb. 3.1 auf Seite 30, [167, 157]) und reduzieren deren Produktivität [356]. Die Reaktionen auf einen solchen Stress sind daher vielfältig und komplex. Mehrere pflanzliche Systeme werden ausgeschaltet und verschiedene Prozesse beschleunigt bzw. verlangsamt [22].

¹<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>

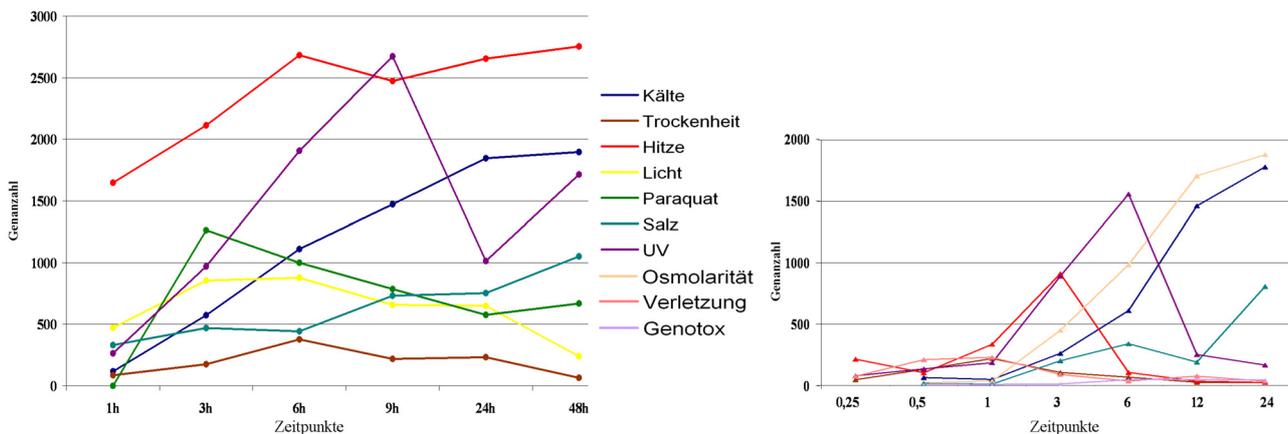


Abbildung 3.11: Deregulierte Gene aller Stressfaktoren. Abgebildet auf der linken Seite wurde die Anzahl aller signifikant deregulierten Gene für jeden Stressfaktor in den unterschiedlichen Zeitpunkten. Hitzestress zeigt eine sehr intensive Reaktion bereits nach einer Stunde. Diese Intensität bleibt während des gesamten Stressverlauf bestehen. UV-Stress beginnt wie die restlichen Stressfaktoren, und steigt kontinuierlich bis zu einem Maximum nach 9h. Anschließend sinkt die Zahl der deregulierten Gene wieder. Die Zahl der an Trockenstress deregulierten Gene bleibt niedrig. Auf der rechten Seite wurde der Expressionsverlauf der Stressfaktoren aus den Experimenten der AtGenExpress Kompendium dargestellt. Während bei manchen Stressfaktoren ein ähnliches Verhalten beobachtet werden kann, wird deutlich, dass ein unterschiedliches experimentelles Design einen großen Einfluss auf die Anzahl der deregulierten Gene ausüben kann. Die transiente Hitzeperiode weist eine deutlichere niedrigere Zahl deregulierter Gene auf, welche bereits nach 3h fast auf Null sinkt.

Hitzestress verursacht die stärkste Stressantwort von *A. thaliana* in dieser Arbeit. Bereits nach einer Stunde werden hunderte von Genen differentiell exprimiert. Wie in Tabelle 3.4 sowie im Diagramm 3.11 ersichtlich ist, wird diese intensive Reaktionsvielfalt im Verlauf der Stressdauer nicht reduziert.

Bei der Reaktion der Pflanze auf den Stress werden als primäre Antwort Gene bzw. Prozesse dereguliert, welche für den Schutz gegen den Stress zuständig und dadurch für das Überleben der Pflanze unverzichtbar sind. Zur primären Gruppe gehören u.a. verschiedene Hitzeschockfaktoren (Hsf) (Abb. 3.13) und deren Zielproteine, die Hitzeschockproteine (HSP). Die meisten Hsfs werden schnell und stark exprimiert. Von den 21 Hsfs in *A. thaliana* wurden über die Hälfte unter Hitzestress differentiell reguliert, wobei die Mehrheit sogar ein hitzespezifisches Verhalten aufgewiesen hat. Als sekundäre Antwort wurden beim anhaltenden Stress Mechanismen für die Verbesserung der Thermotoleranz aktiviert. Weil die Pflanze Energie für den Schutz gegen den Stress benötigt, wurden verschiedene Prozesse herabreguliert, um Ressourcen für die lebenswichtigen metabolischen Prozesse zu sparen. In der Literatur werden verschiedene Gene als Biomarker für die Reaktion auf Hitzestress klassifiziert. Einige Hsf-Proteine werden als Biomarker für die Hitzereaktion angesehen (Abb. 3.13). HsfA1, -A2 und -A3 wurden als Masterregulatoren in der pflanzlichen Antwort auf Hitzestress identifiziert [210, 228, 274, 356]. Sie regulieren mehrere Stoffwechselwege und kontrollieren verschiedene zelluläre Prozesse. Die Hsfs beteiligen sich an der Regulation von ROS-Elementen sowie an der Herabsetzung der Photosyntheserate und des Kohlenhydratmetabolismus [238, 212, 213, 209, 330].

Aufgrund der Unvollständigkeit der *Arabidopsis*-Annotationen wurden hier mehrere Gene ohne bekannte Funktionen identifiziert. Unter diesen befinden sich auch solche mit einer Hitzestress-spezifischen Antwort (Abb. 3.13). Die weitere Erforschung solcher Gene kann weitere Erkenntnisse über den Stressverlauf und die Reaktion der Pflanze auf den Stress erbringen. Die genaue Funktion der Gene At4g17250 und At4g21320 wurde bisher noch nicht identifiziert. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Akklimatisierung bei Hitzestress spielen. Das Expressionsverhalten dieser Gene in dieser Analyse bestätigt diese Annahme (Abb. 3.13). Das dritte Gen At2g07722 ist bislang komplett unbekannt. Weder seine Funktion noch dessen biologischer Prozess sind bekannt. Anhand seines

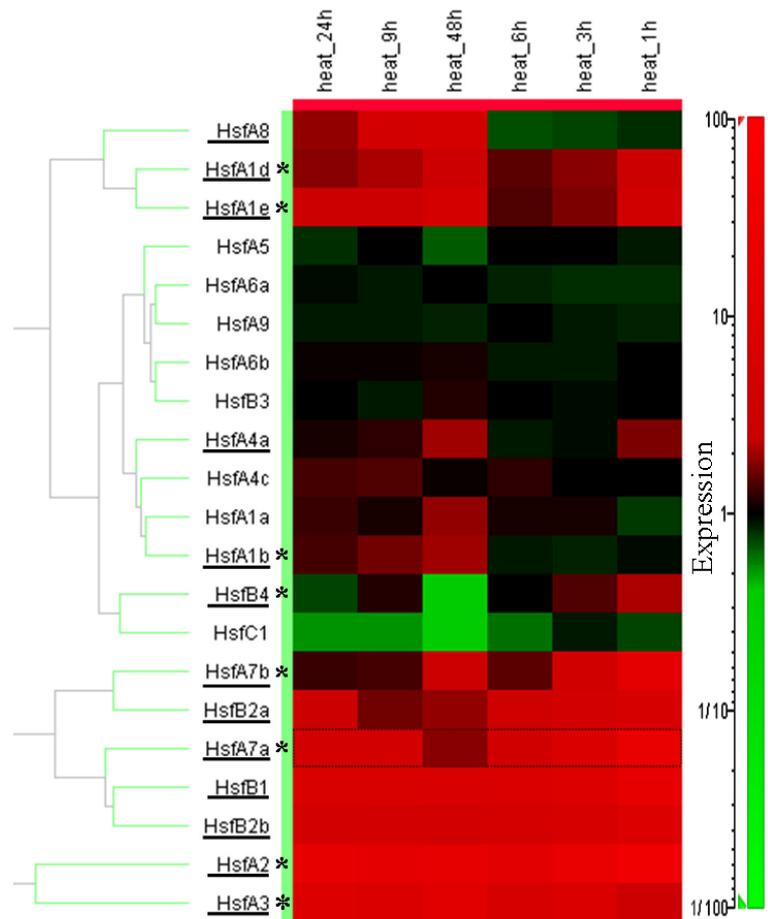


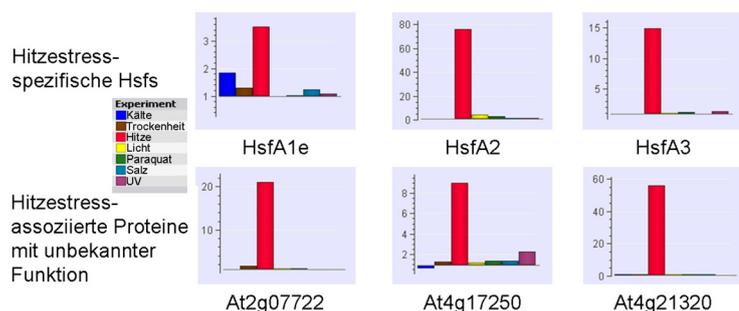
Abbildung 3.12: Das Expressionsverhalten der Hsf-Gene unter Hitze Das Expressionsverhalten der 21 *Arabidopsis*-Hsfs unterscheidet sich je nach Wachstumsstadium bzw. Organelle. 13 Hsfs werden unter Hitze differentiell reguliert (unterstrichene Proteine). Über die Hälfte (*) weisen in dieser Arbeit sogar eine hitzespezifische Antwort auf. Die 2D-hierarchische Clusteranalyse wurde mit den gemittelten Expressionswerten aller Experimente durchgeführt. Als Distanzmatrize wurde der Euklidische Algorithmus verwendet [133].

Expressionsverhaltens lässt sich jedoch eine Rolle in der Regulation des Hitzestresses vermuten.

Aus 42.000 *Arabidopsis*-Genen werden auf den AFFYMETRIX ATH1 Arrays 24.000 Gene für die Analyse aufgetragen. Aufgrund der unvollständigen Annotationen weist *A. thaliana* mehrere Proteine mit einer unbekanntem Funktion bzw. Domäne auf, sowie solche mit bekannten Proteindomänen, deren Funktion noch nicht identifiziert wurde. Nicht annotierte Gene bzw. die dazugehörigen Proteine wurden in dieser Analyse nicht weiter betrachtet. Ein Drittel dieser Gene zeigt eine hitzespezifische differentiell regulierte Expression.

Hitze verursacht eine enorme Umgestaltung des pflanzlichen Haushalts. Mehrere metabolische Prozesse und molekulare Funktionen werden dadurch intensiver aktiviert (Tab. 3.5) bzw. durch den Stress geblockt (Tab. 3.6). Unter Hitze findet die Deregulation verschiedener Hsfs sehr früh im Stress-

Abbildung 3.13: Hitzestressfaktoren als Biomarker für Hitzestress Bekannte Hitzestressfaktoren wurden spezifisch unter Hitze dereguliert. In dieser Arbeit wurde auch für weitere Gene mit einer bisher noch unbekanntem Funktion eine hitzespezifische Antwort festgestellt. Drei Beispiele werden in der unteren Reihe dargestellt. Aufgetragen wurden die gemittelten relativen Expressionswerte für jeden Stressfaktor über alle Zeitpunkte.



Genname	AGI Nummer	Bezeichnung	Fold Induktion	Zeitpunkt
Transkriptionsfaktoren				
HsfA2	AT2G26150	heat shock factor A2	192,60	1h
HsfB1	AT4G36988	heat shock factor B1	53,70	1h
DREB2A	AT5G05410	DRE binding protein 2A	53,9	1h
abiotischer Stress				
HSP17,4	AT3G46230	Heat shock protein 17	452,4	3h
HSP70B	AT1G16030	Heat shock protein 70B	179,30	1h
HSP15,7	AT5G37670	Heat shock protein like	118,50	1h
RNA Regulation				
SDG37	AT2G17900	Set domain group 37	14,60	1h
TAF7	AT1G55300	TBP associated factor 7	3,90	1h
GBF4	AT1G03970	G-box binding protein	3,80	1h
Proteinabbau				
EGY3	AT1G17870	Ethylene-dependent Gravitropism deficient	42,80	3h
UBA	AT2G41160	Ubiquitin-associated	12,40	1h
UBP19	AT2G02360	Ubiquitin specific protease 19	6,80	48h
Programmierter Zelltod				
BAG6	AT2G46240	BCL-2 associated athanogene 6	195,00	1h
BI-1	AT5G47120	Bax inhibitor 1	3,55	1h
PA15	AT2G34040	Apoptosis inhibitory 5	3,20	1h
Chromatinmodellierung				
CHR9	AT1G03750	Chromatin Remodelling 9	5,50	1h
LOS4	AT3G53110	Low expression of osmotically responsive genes 1	5,00	48h
GTE2	AT5G10550	global TF group E 2	2,80	1h
Proteinfaltung				
CYP2	AT2G21130	Cyclophilin 2	46,60	48h
CPN10	AT1G14980	Chaperonin 10	3,60	1h
AR192	AT4G26780	Adenyl-nucleotide exchange factor	21,00	1h
Ribosomebiogenese				
eEF1	AT5G12110	Elongation factor 1B	38,00	6h
RPS4	ATMG00290	Ribosomal protein S12	37,17	1h
RPL16	ATMG00080	Ribosomal protein L16	20,90	24h
Elektronentransportkette				
NAD6	AT2G07731	NADH dehydrogenase subunit 6	73,70	9h
COX3	AT2G07687	Cytochrome c oxidase subunit 3	85,30	48h
CYTb	AT2G07727	Cytochrome b	45,20	48h
biotischer Stress				
Thaumatococcus	AT4G36010	thaumatin family protein	44,10	48h
ADRL-2	AT5G04720	ADRL-like 2	4,40	48h
ADL4	AT3G60190	Dynamic-like protein 4	3,40	48h
unbekannte Funktion				
AT5G10695		unbekannte Funktion	77,36	1h
AT3G09350		unbekannte Funktion	52,98	1h
AT1G03070		unbekannte Funktion	58,80	1h
AT1G30070		unbekannte Funktion	37,65	1h

Tabelle 3.5: Ausgewählte signifikant-hochregulierte Gene ($FC \geq 2$, $p \leq 0,01$) in verschiedenen biologischen Prozessen bzw. molekularen Funktionen unter Hitzestress. Die eingetragene Foldinduktion (FC) entspricht dem ermittelten höchsten Wert im Stressverlauf. Die meisten dieser Gene weisen ein Expressionsmaximum in den früheren Zeitpunkten auf. In dieser Analyse wurden ebenfalls mehrere Gene mit einer Reaktion auf Hitzestress, für die noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, festgestellt.

verlauf statt (Tab. 3.5 und [148]). Bereits nach der ersten Messung zeigen sie eine starke, zum Teil stressspezifische, Reaktion (Abb. 3.13). Als Folge dieser Expressionsintensivierung wurde die Expression verschiedener HSPs erhöht (Tab. 3.5). TBP-assoziierte Faktoren (TAF) sowie weitere Gene der RNA-Regulation wurden stärker exprimiert. Um die Qualität bzw. die Quantität der Proteine zu erhöhen, wurden anschließend Elongationsfaktoren sowie Gene für die Herstellung ribosomaler Proteine exprimiert (RPS- und RPL-Familien). Hitzestress beeinflusst die Proteinfaltung [175]. Aus diesem Grund wurde erwartet, dass Gene der Chromatinmodellierung (u.a. CHR9 oder LOS4, Tab 3.5) oder Chaperone und Cyclophiline, die den Faltungsprozess unterstützen, im gesamten Stressverlauf stärker exprimiert werden. Während die Elektronentransportkette unter Hitzestress ohne Unterbrechung weiter läuft, wird die Funktion des photosynthetischen Apparatus stark beeinträchtigt (Tab. 3.6, Abb. 3.17). Gene der Elektronentransportkette wurden hier von Beginn an hoch exprimiert. Sie erreichen ein Maximum in den späteren Messungseinheiten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Gene der PS-I und -II am stärksten herabreguliert. Dieser Prozess führt zu einer erhöhten Konzentration der ROS-Elemente, die wiederum für die Einleitung des programmierten Zelltodes sorgen.

Während aufgrund des Stresses Gene der regulatorischen Prozesse zum Schutz der Pflanze hoch

Genname	AGI Nummer	Bezeichnung	Fold Induktion	Zeitpunkt
Aminosäuremetabolismus				
GLDP	AT4G33010	Glycine decarboxylase P protein	37,3	48h
AKN2	AT4G39940	APS kinase 2	28,4	48h
PEN2	AT2G44490	Penetration 2	23,2	48h
Chromatinstruktur				
HMGB2	AT1G20693	High mobility group protein B2	38,8	6h
HIS1-3	AT2G18050	Histone H1-3	12,4	3h
HTA6	AT5G59870	Histone H2A like	41,8	6h
Energiemetabolismus				
LHCB2:4	AT3G27690	PS-II light harvesting complex	109,0	9h
ACL	AT2G23600	Acetone cyanohydrine lyase	34,6	48h
PRXR1	AT4G21960	Peroxidase 42	22,8	48h
Kohlenhydratmetabolismus				
BETAFRUCT4	AT1G12240	Vacuolar invertase	64,3	48h
APL1	AT5G19220	ADP-glucose pyrophosphorylase	55,1	48h
CYP83A1	AT4G13770	Cytochrome P450 monooxygenase	53,7	48h
Lipidmetabolismus				
CpuORF32	AT1G73602	Open reading frame 32	56,0	3h
ELP	AT1G12090	Extensin-like protein	31,4	48h
LTL1	AT3G04290	Li-tolerant lipase 1	23,6	48h
Phytohormonmetabolismen				
ABA1 (ZEP)	AT5G67030	Zeaxanthin epoxidase	32,2	48h
LOX2	AT3G45140	Lipoxygenase 2	27,0	48h
AOP2	AT4G03060	Alkenyl hydroxalkyl producing 2	22,3	48h
Sekundärmetabolismen				
4CL1	AT1G51680	4-Coumaroyl-CoA ligase	47,6	48h
DFR	AT5G42800	Dihydroflavonol 4-reductase	47,5	48h
F3H	AT3G51240	Flavonone 3-hydroxylase	40,6	48h
Transkriptionsfaktoren				
COL2	AT3G02380	Constans-like 2	57,8	9h
LHY	AT1G01060	Late elongated hypocotyl	42,9	48h
MYB28	AT5G61420	Myb domain protein 28	40,5	48h
Zellwand und Zytoskelettstruktur				
EXPA1	AT1G69530	Expansin A1	57,7	48h
EXPA8	AT2G40610	Expansin A8	38,6	9h
CSLD5	AT1G02730	Cellulose synthase-like D5	28,2	6h
Unbekannte Funktion				
unbekannt	AT3G47295		34	48h
unbekannt	AT1G60010		36	48h
OFFP16	AT2G32100	ovate family protein 16	25	48h
unbekannt	AT5G67370		27	48h
Unbekannt				
AT1G78170		unbekannte Funktion	73	24h
AT5G08390		unbekannte Funktion	25	48h
AT4G39860		unbekannte Funktion	74	24h

Tabelle 3.6: Ausgewählte signifikant-herabregulierte Gene ($FC \geq 2$, $p \leq 0.01$) in verschiedenen biologischen Prozessen bzw. molekularen Funktionen unter Hitzestress. Die eingetragene Foldinduktion (FC) entspricht dem niedrigsten Wert im Stressverlauf. Die meisten Gene wurden in der späteren Zeitpunkten maximal reprimiert. Diese Gene gehören zu den metabolischen Prozessen der sekundären Antwort, die in den späteren Phasen der Stressreaktion abgeschaltet werden. In dieser Gruppe waren ebenfalls Gene mit einer Stressreaktion, deren Funktion noch nicht identifiziert wurde, nachgewiesen.

exprimiert wurden, zeigen viele Gene der metabolischen Signalübertragungswege eine negative Korrelation zum Stressverlauf. Die Herabregulierung der Gene der (sekundär-) metabolischen Prozesse erreicht ein Maximum zu späteren Zeitpunkten (Tab. 3.6). Gene der Photosynthese bzw. des Calvinzyklus wurden stetig mit der Zeit herabreguliert. Die Lichtsammelkomplexe (LHCa sowie LHCb Gene) wurden fast ausnahmslos reprimiert. Aufgrund der sinkenden Energieproduktion wurden weitere Prozesse verlangsamt. Weitere Gene des Kohlenhydratmetabolismus, des Aminosäuremetabolismus und von verschiedenen Sekundärmetabolismen wurden in Tabelle 3.6 aufgelistet. Des Weiteren beeinflusst der Hitzestress die strukturelle Integrität der Zelle. Expansine sowie Cellulosesynthasen wurden bereits früher im Stressverlauf reprimiert. Die Herabregulierung der Gene für die Chromatinstruktur ist ein weiterer Schritt in der stressbedingten Deregulation der Transkriptions- und Translationsprozesse. Das Fehlen von Histogenen führt zur Lockerung der DNA-Struktur und somit möglicherweise zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate.

In Tabellen 3.5 sowie 3.6 wurden exemplarisch stressspezifische, stark deregulierte Gene aufgelistet, deren Funktion noch nicht identifiziert werden konnte. Es zeigt sich, dass noch viel über das *Arabidopsis*-Genom nicht bekannt ist. Für das vollständige Verstehen der regulatorischen bzw. meta-

bolischen Veränderungen, die aufgrund des Stresses auftreten, werden weitere Experimente benötigt.

Funktionelle Modifikationen der biologischen Prozesse in der Pflanze als Reaktion auf Hitzestress mit Hilfe von Gensignaturen Die Erkenntnisse über die unterschiedlichen Veränderungen im Stoffwechsel aufgrund eines Stressfaktors sind hilfreich, um die Gesamtreaktion der Pflanze auf Stress zu verstehen [289, 95]. Die Analyse einzelner differentiell-regulierter Gene wurde im vorherigen Abschnitt besprochen. Moderate Veränderungen im Expressionsverhalten eines Gens waren mit dieser Analyse aufgrund der eingesetzten Parameter nicht erkennbar. Gene mit einer schwächeren Expressionsintensität wurden nicht weiter betrachtet, da es nicht möglich war, sie vom fehlerhaften Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Wenn mehrere Gene aus dem gleichen Prozess, Stoffwechselweg oder einer ähnlichen Funktion eine schwache Expressionsintensität aufweisen, können sie mit der verwendeten Testmethode nicht identifiziert werden [29]. Eine Möglichkeit, solche kleinen Variationen zu erkennen, liefert die Anreicherungsanalyse kompletter Gensets. Auf dieser Ebene können Gengruppen gefunden werden, welche ein ähnliches Expressionsmuster in allen Experimenten aufweisen.

Mit Hilfe der Genset-Anreicherungsanalyse (GSEA, [299]) können stressbedingte biologische Veränderungen auf kategorischer Ebene identifiziert werden (Tab. 3.7). Die Akkumulation der Gene eines 'a priori'-definierten Gensets im oberen bzw. unteren Bereich der nach dem Enrichmentscore sortierten Liste deutet auf eine funktionelle Regulation dieses Gensets durch den Stressfaktor hin.

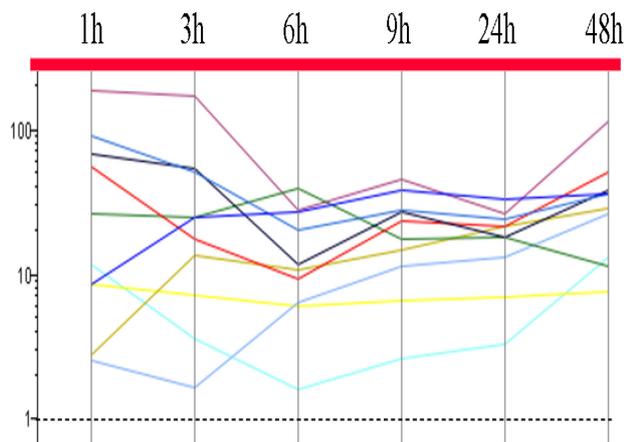
Die Information für die Gengruppen stammt aus öffentlichen und intern generierten Gensets verschiedener Funktionen. Während der Stressreaktion wurden komplette Signalübertragungswege verändert. Die Information über Proteinfamilien (Pfam, [74]), Stoffwechselwege (KEGG, [139]) und metabolische Signalwege (Mapman, [312], AraCyc, eine spezifische *Arabidopsis*-Datenbank für metabolische Stoffwechselwege [219]) wurde deshalb für die Erstellung der Vergleichsbibliothek verwendet. Für den Vergleich mit verschiedenen Stressfaktoren wurden weitere Analysen mit einem ähnlichen experimentellen Design verwendet [148, 189, 255, 337], welche ebenfalls die Reaktion der *Arabidopsis*-Pflanze auf abiotischen Stress untersucht haben.

Die Informationen über Proteindomänen (Transmembranproteine), die Lokalisation (TargetP) und Funktionen (Kinasen) wurden analysiert, um festzustellen, ob funktionelle Gruppen bei bestimmten Stressfaktoren oder Zeitpunkten eine signifikant erhöhte/reduzierte Aktivität aufweisen. Die GO-Annotationen wurden hinzugefügt, da sie Informationen über biologische Funktionen, molekulare Prozesse und die zelluläre Lokalisation liefern. Für die Analyse wurden die Affymetrix Chip-Sequenzen gegen die TAIR-DB geblastet (Version 8, [303]). Informationen über Transkriptionsfaktorbindestellen wurden zur Bibliothek hinzugefügt (DATF, [302], TransBCS, [71]). Eine Akkumulation von bestimmten Promotordomänen bei bestimmten Stressfaktoren kann viel über die Funktionen dieser Stelle bzw. über die Gene mit einer solchen Sequenz im proximalen Promotorbereich aussagen. Eine Zusammenfassung aller Informationen für die GSEA-Analyse ist in Tabelle 2.2 auf Seite 24 eingefügt. Die Erstellung der GSEA-Bibliothek aus öffentlichen und internen Datensätzen gewährleistet die Qualität der Resultate und ermöglicht die Beantwortung verschiedener, spezieller Fragestellungen. Diese Kombination stellt die Spezifität der Ergebnisse sicher.

Durch den Vergleich der stressderegulierten Gene mit den differentiell exprimierten Genen anderer Stressfaktoren wurden zwei Aspekte verfolgt. Zum einen wird der verwendete Datensatz auf seine Qualität bzw. Vergleichbarkeit durch den Vergleich mit verschiedenen Literaturquellen überprüft. Desweiteren wurden gemeinsame Gengruppen bzw. biologische Funktionen, welche bei unterschiedlichen Stressfaktoren zur gleichen Zeit bzw. zeitversetzt aktiviert oder reprimiert wurden, auf diese

GO-Level	biol. Funktion	Gengruppen	1h	3h	6h	9h	24h	48h	Quelle	
hormonelle Antwort	Cytokinin	ARR Gene - Transkriptionsregulation				+	+	+	1,2	
	Reaktion auf ABA	3h	+						1	
	Auxin	3h	+					+	1,2,5	
	Jasmonsäure					+	+	+	2,3	
Transkription	Transkription								2	
	Transkriptionsfaktoren	bZIP		+	+	+	+	+	2,5	
		SNF2			+				+	3,4
		HSF		+	+				+	4,7
		HB		+	+			+	+	3,4,6
		bHLH							+	4,7
	DNA	Replikation	+	+					3	
packaging			+	+				2,5,6		
Translation	Translation	RNA-Polymerase				+	+	+	2,5	
	RNA spleißen	RNA-Polymerase	+	+	+	+	+	+	2,5	
	RNA metabolische Prozesse, Binding	rRNA, mRNA,	+	+	+	+	+	+	2,3,4	
	Ribosomen	DEAD (Helikase)		+	+	+	+	+	2,4	
Protein modifikationen	Faltung	Chaperone	+	+	+	+	+	+	2,3	
	Abbau	Ubiquitination, Neddylation, Proteolysis		+	+	+	+	+	2,5	
	Proteosome complex					+	+	+	2,4	
	Hitzeschockproteine	HSP20, HSP70, DnaJ	+	+	+	+	+	+	2,3,4	
	katabolische Prozesse					+	+	+	2	
Signal-/ Bindeprozesse	Proteinkinasen	RLK				+			2,3,8	
		MAPK -Aktivität	+	+	+	+	+	+	2,3,8	
	Protein-Protein Interaktionen	TPR, PPR	+			+	+	+	4,7	
	GTPase BP	HSR1 like			+				4	
ZF-CCHC	Zink-knuckle							2,5		
Transport	Elektronen-/Protonentransport		+	+	+	+		+	2,3	
	Membrantransport		+	+		+	+	+	2,3	
	Proteintransport	Translocasekomplex			+	+	+	+	2	
	Protein targeting					+		+	3	
	Intrazellulärer Transport	cytoskeleton-dependent		+	+	+		+	2	
	Transporter für organische Säure					+			2,4	
	Metalliontransport				+	+	+	+	2	
	Zuckertransport	Sukrose, Saccharide				+	+	+	2,3	
Entwicklung	Cuticle					+		2		
zelluläre Prozesse	Zellwachstum	cyclin CDKs,	+	+	+				2,3,4	
	Zellbewegung		+						2	
	Miose							+	2	
zelluläre Strukturen	Motoraktivität	kinesin, expansin	+	+	+	+	+		2,6	
	Microtubuli Aktivitäten	kinesin, expansin	+	+	+	+	+		2	
	Cytoskeleton	biogenesis		+	+	+			2	
	Nukleosome	Histone, Chromatin	+	+	+	+	+	+	2,3,4	
	Zellwand	Apoplast, Cellulose	+	+	+	+			2	
		Pectatelyase			+				+	2,4
	Chloroplast	thylakoid plastoglobule, PS-I, PS-II				+	+	+	2,3	
	Photosysteme	PS-I PS-II			+				1,2	
	Nuklearer Speck	Spliessfaktoren	+	+	+	+	+	+	2,6	
	Membrane	Transmembranproteine, ER	+						2	
	Nukleus	nukleare Lumen, Nukleolus				+	+	+	2	
Signalosome	Proteindeneddylation		+	+	+	+	+	2,4		
Energie metabolismen	Stickstoffmetabolismus					+		+	5	
	Schwefelmetabolismus	Assimilation	+	+		+	+		2,5	
	Photosynthese	Lichtreaktion				+		+	2,5,6	
	Reaktion auf oxidative Phosphorylierung	Respirationsprozesse, NADH-Dehydrogenase	+	+	+	+	+	+	2,6	
Sekundär-metabolismen-	UDP-Glycosyltransferase activity	Anthocyanpigment Biosynthese					+	+	2,4	
	Sekundärprozesse						+	+	2	
Aminosäure metabolismen	aromatische Verbindungen		+		+	+			1,3,4	
Lipid metabolismus	Phenylpropanoid, Transferase, Tetraterpenoid	Lignin	+		+	+	+	+	2,4,5	
	Phospholipide		+						2,3	
	Polyketide			+					2	
	Oxylipin, Fettsäure		+	+	+	+	+	+	2	
Kohlenhydrat-metabolismus	Carotenoide	Terpenoide, Isoprenoide						+	3,5	
	Glycoproteine		+				+	+	1,3	
	Glycosinolatebiosynthese				+	+	+	+	1,4,6	
	Stärkemetabolismus			+	+				1,2	
Oxido-reduktasen	Jacalin, Lectin						+	+	2	
	NADH-Dehydrogenase		+	+	+	+		+	1,2,5	
	Cytochromekomplex Assemblierung	Biogenese	+	+		+			1,2	

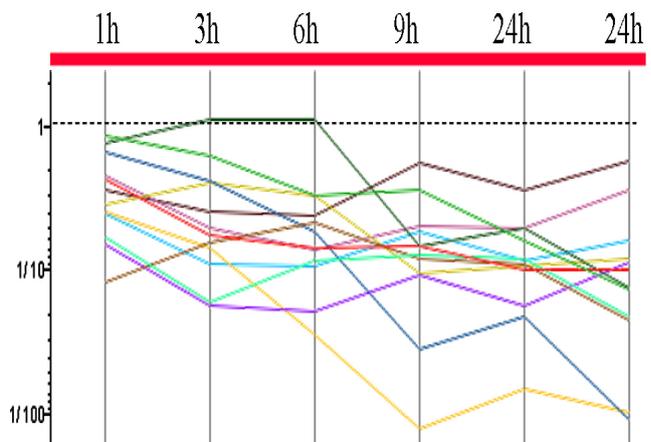
Tabelle 3.7: Anreicherung biologischer Funktionen unter Hitzestress. Der Vielfalt der Stressantwort auf Hitze ist durch den Vergleich der deregulierten Gene mit externen Gensignaturen möglich. Die Akkumulation von hochregulierten Gengruppen (rot) wird bei den RNA- und DNA-Prozessen erkennbar. Oxidative Phosphorylierung und die Elektronentransportkette werden unter Hitze intensiver betrieben. Dagegen werden metabolische Prozesse wie Energie-, Kohlenhydrat- oder Sekundärmetabolismen verlangsamt (grün). Die strukturelle Integrität der Zellwand wird ebenfalls schwächer. Die Biogenese der Zellwandproteine und des Zytoskeletts wird reduziert. 1-Literaturquellen; 2- GO-Annotationen; 3- Mapman; 4-Pfam; 5-KEGG; 6- AraCyc; 7-DATF; 8- Kinasen



Genname	Gen-ID	biologische Funktion	Max. Expression
ZAT12	247655_at	Transkriptionsfaktor	12.63
SRP30	264255_at	Spleißfaktor	8.26
NAD7	244925_at	NADH-Dehydrogenase	24.98
HSP70	261838_at	Hitzeschutz	179.29
HSfA3	250910_at	Transkriptionsfaktor	27.73
eEF1	250304_at	Elongationsfaktor (Translation)	38.0
DREB2A	250781_at	Transkriptionsfaktor	53.89
Cyt bc ₁	246944_at	Ionentransport	64.95
DNAJ	258984_at	Chaperone	87.92982
RPS4	266042_s_at	Ribosomenbiosynthese	37.17

Abbildung 3.14: Veränderte Expression unter Hitzestress.

Verschiedene Transkriptionsfaktoren, Elemente der Transkriptions- oder Translationsprozesse oder Ionentransport werden durch Hitze hochreguliert. Die frühe starke Expression dieser Gene und die darauffolgende Senkung deuten auf deren Rolle in der primären Stresserkennung hin, welche anschließende Mechanismen kontrolliert und reguliert. Dazu gehören Gene zum Schutz vor Hitze wie z.B. HSPs. Die Tabelle listet den höchsten erreichten Expressionswert in dieser Arbeit auf (Werte sind relativ zur Kontrolle aufgetragen).



Genname	Gen-ID	biologische Funktion	Min. Expression
NACK1	261660_at	Kinesin-Motorprotein	1/9.40
CYCI	253051_at	Cyclin - Zellzyklusprotein	1/4.19
LTP	248683_at	Lipidtransferprotein	1/125.6
UDP	249469_at	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1/7.29
CYP96	252911_at	Energiemetabolismus	1/10.77
LHCB2	258239_at	chlorophyll A-B binding protein	1/109
PC	253480_at	Energiemetabolismus	1/19.4
SULT	255773_at	Schwefelmetabolismus	1/22.3
GH9C2	259736_at	Kohlenhydratmetabolismus	1/21.17
GBSS	261191_at	Kohlenhydratmetabolismus	1/13.46
ASP4	262646_at	Aminosäuremetabolismus	1/10.08
COR13	254232_at	Cofaktormetabolismus	1/13.8

Abbildung 3.15: Repression verschiedener Gene als Reaktion auf Hitzestress.

Aufgrund des Stresses werden mehrere metabolische Prozesse herabreguliert. Zu dieser Gruppe gehören Proteine der Energie-, Kohlenhydrat- sowie Lipidmetabolismen. Die Tabelle zeigt den relativen niedrigsten Expressionswert der Gene in dieser Arbeit (stärkste Repression).

Weise identifiziert.

Die Hitzestressanalyse zeigt eine hohe Ähnlichkeit zwischen den eigenen Daten und vergleichbaren Experimenten aus anderen Laboren [148, 337, 189, 213]. Bei den Experimenten des AtGen-Express Konsortiums [148] wurden Proben aus früheren Zeitpunkten analysiert. Das Genexpressionsmuster in diesen Versuchen zeigt einen ähnlichen Verlauf wie in dieser Arbeit. Daraus lässt sich schließen, dass die Genexpression in früheren, in dieser Analyse nicht gemessenen Zeitpunkten, ebenfalls ähnlich verläuft. Dadurch wird ein Einblick in die Anfangsphase der Stressreaktion gewonnen. Die einzelnen Zeitpunkte weisen keine punktuellen Treffer auf, sondern einen kontinuierlichen Verlauf über alle Zeiten. Die Reaktion der Pflanze ist nicht auf einen Zeitpunkt begrenzt. Aktivierte Gene üben ihre Funktion länger als eine Messungseinheit aus. Aus diesem Grund wurden verschiedene Zeitpunkte in mehreren Vergleichen gefunden.

Wie in Tabelle 3.7 zusammengefasst wurde, verursacht Hitze eine starke Deregulation mehrerer Prozesse der DNA- sowie RNA- und Proteinmodifizierung. In den ersten Zeitmessungen wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren sowie Replikationselemente identifiziert. Hitze verursacht eine Umstellung des Proteinhaushalts in der Pflanze. Translations- und Transkriptionsprozesse wurden verstärkt betrieben. Entsprechend aktiver wurden auch die Ribosomenbiogenese und die Spleißprozesse, welche für die Anfertigung der Proteine nötig sind. Durch die Hitze häufen sich falsche Konformationen bzw. Faltungen der neu synthetisierten Proteine an. Diese müssen korrigiert werden. Der zelluläre

Ionen-transport (vor allem Elektronen in der Elektronentransportkette) arbeitet intensiver, ebenso die Cytochrome und NADH-Dehydrogenasen als Teil der Elektronentransportkette, die für den Ionen-transfer zuständig sind (Abb. 3.14). Spleiß- und ribosomale Elemente wurden aufgrund des Stresses kontinuierlich höher exprimiert. Die frühere Reaktion der ABA-abhängigen Prozesse zusammen mit der erhöhten Expression der Hitzeschockproteine (HSP20, HSP70 sowie DnaJ-Familien) stellt ein Zeichen für den Versuch der Pflanze dar, den Stress zu bekämpfen. Während die Elektronentransportkette hoch reguliert wurde, weisen die intrazellulären sowie Zucker- und weiteren Transportmechanismen eine kontinuierliche Senkung ihrer Aktivität auf. Wie in Tabelle 3.7 zusammengefasst wurde, hat der Hitzestress zur Folge, dass die strukturelle Integrität der Zelle nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Gengruppen der strukturellen Integrität (Zytoskelett, Mikrotubuli, Nukleosome) sowie Zellteilungsprozesse wurden, genauso wie verschiedene Transportmechanismen der Sekundärmetaboliten (Zucker, Ionen), schwächer exprimiert (Abb. 3.15). Der Grund dafür ist die Repression verschiedener Prozesse der Energie- (Photosynthese, Photosystemen I und II) sowie der Kohlenhydratmetabolismen. Die Reduktion weiterer sekundärmetabolischer Prozesse wie der Biosynthese von Aminosäuren oder Lipiden ist eine weitere Auswirkung der Stressreaktion. Diese metabolischen Stoffwechselwege wurden verlangsamt, damit die Pflanze ihre Ressourcen auf die Stresssituation konzentrieren kann.

Die Analyse der Promotorregionen nach vordefinierten Transkriptionsfaktorbindestellen Durch die Veränderung der Genexpression kann die Pflanze auf ihre veränderte Umgebung reagieren [21, 170]. Pflanzen besitzen mehr als 1500 Transkriptionsfaktoren, die jeweils Dutzende bis Hunderte Gene in verschiedenen bzw. ineinander greifenden Signaltransduktionskaskaden kontrollieren [326]. Die Identifizierung solcher Promotorregionen und die Erkennung der Prozesse, die zum Binden der Transkriptionsfaktoren an diesen Stellen führen, kann wesentlich zum Verständnis der Kontrollmechanismen bei der Induktion bzw. Repression der Genexpression als Reaktion auf Veränderungen in der Umgebung beitragen. Schlüsselgene, die bei mehreren Signalkaskaden von verschiedenen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, sollten dementsprechend mehr *cis*-regulatorische Elemente in ihrer proximalen Promotorregion aufweisen.

Alle deregulierten Gene wurden auf *cis*-regulatorische Elemente im Promotorbereich analysiert. Die Anreicherung der einzelnen Motive wurde mittels Fisher's Exact Test [75] für jeden Stressfaktor bei einem Schwellenwert von $p < 1E^{-3}$ notiert (Abb. 3.9, 3.11).

Hochregulierte Motive			herabregulierte Motive		
Motivename	Motivsequenz	Quelle	Motivename	Motivsequenz	Quelle
ABRELATERD1	ACGTG	Simpson et al. [290]	ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGKC	Hattori et al. [103]
ABRE-like binding site motif	AACGTG[GT][AC]	Shinozaki et al. [286]	EBOXBNNAPA	CAnnTG	Stalberg et al. [297]
ABRERATCAL	[AC]ACG[CT]GA	Kaplan et al. [142]	IBOX	GATAAG	Giuliano et al. [88]
CACGTGMOTIF	CACGTG	Chandrasekharan et al. [47]	MYCATRD1	CATGTG	Simpson et al. [290]
ACGTABREMOTIFA2OSEM	ACGTGKC	Hattori et al. [103]	MYCATRD22	CACATG	Abe et al. [2]
ACGTATERD1	ACGT	Simpson et al. [290]	POLASIG1	AATAAA	Heidecker et al. [107]
GADOWNAT	ACGTGTC	Ogawa et al. [233]	ABRELATERD1	ACGTG	Simpson et al. [290]
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	Mohanty et al. [215]	ABRERATCAL	[AC]ACG[CT]GA	Kaplan et al. [142]
CARGATCONSENSUS	CC[AT](6)GG	Hepworth et al. [110]	ANAERO1CONSENSUS	AAACAAA	Mohanty et al. [215]
HEXAMERATH4	CCGTGC	Chaubert et al. [48]	Bellringer/replumless/pennywise BS1 IN AG	AAATATAA	Bao et al. [24]
HSEs binding site motif	AGAAnnTTCT	Nover et al. [232]	DBFCOREDCDC3	ACAAnnG	Kim et al. [151]
MYBCOREATCYCB1	AACGG	Planchais et al. [247]	GADOWNAT	ACGTGTC	Ogawa et al. [233]
SURECOREATSULTR11	GAGAC	Maruyama-Nakashita et al. [195]	GAREAT	TAACAA[AG]	Ogawa et al. [233]
UP1ATMSD	GGCCCA[AT][AT][AT]	Tatematsu et al. [308]	LIBOXATPDF1	TAATG[CT]A	Abe et al. [2]
SITEHATCYTC	TGGGC[CT]	Welchen et al. [334]	MYBPLANT	[AC]ACCIAT[AC]C	Sablowski et al. [263]
SORLIP2AT	GGCC	Hudson et al. [125]	UPRMOTIFAT	Cn(12)CCACG	Martinez t al. [194]
TELOBOXATEEF1AA1	AAACCCTAA	Tremoussayque et al. [315]	HEXAT	TGACGTGG	Schindler et al. [271]
UP2ATMSD	AAACCCTA	Tatematsu et al. [308]	SORLIP1AT	GCCAC	Hudson et al. [125]

Tabelle 3.8: Transkriptionsfaktorbindestellen unter Hitzestress Aufgelistet sind Motive im proximalen Promotorbereich, welche unter Hitzestress als überrepräsentativ identifiziert wurden. Diese TFBS wurden mittels eines Fisher-Exact Tests mit einem Schwellenwert von $1E^{-3}$ in der 1000 Basen vor dem Translationsbeginn identifiziert. Die Sequenzen der jeweiligen Motiven sind hier in Fuzznuc Form angegeben [30].

In der Tabelle 3.8 wurden alle unter Hitzestress angereicherten Bindestellen für die hoch- bzw. herabregulierten Gene aufgelistet. Alle stressbedingten Motive wurden bei allen Stressfaktoren wiedergefunden. Sie besitzen eine ABA-abhängige Promotorbindestelle (ABRE-Motive [188, 197], ACGTATERD1 [290], GADOWNAT [121]). Das deutet auf eine allgemeine, ABA-abhängige (Abscisinsäure) Stressantwort hin, welche unter Hitzestress interessanterweise nur in den ersten zwei Messpunkten zu beobachten ist. Die spätere Reaktion der Pflanze wirkt hitzespezifisch (Tab. 3.9). Bei der Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) wurden verschiedene hitzespezifische Promotormotive identifiziert (Tab. 3.9). Die direkte Rolle der Motive HSE-BS und UP1ATMSD in der Regulation der Hitzestressantwort wurde bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen [81, 232, 308, 324]. Eine dritte Gruppe beinhaltet die temperaturabhängigen Promotormotive, deren Gene sowohl unter Hitze als auch unter Kälte signifikant differentiell reguliert wurden (Tab. 3.9).

Viele hitzeinduzierten Gene weisen das palindromische Bindestellenmotiv AGAAnnTTCT in ihrem Promotorbereich auf (Hitzestresselemente, HSE [81, 232]). Die Hitzeschockfaktoren [28] und weitere hitzeregulierende Transkriptionsfaktoren (z.B. bZIP28 [81]) erkennen dieses Motiv und binden dort. Diese Proteine dienen als Hitze-Früherkennungssystem für die Pflanze und sind sofort beim Eintreten in die Stresssituation einsatzbereit. Als Teil dieser primären Stressantwort sind sie bereits in den ersten zwei Messeinheiten übermäßig aktiv. Anschließend geht die Pflanze in die zweite Phase (die Sekundärantwort) über. Hier wurden weitere Mechanismen aktiviert, welche unabhängig von HSE-Elementen funktionieren.

Das Proteinbindemotiv UP1ATMSD mit der DNA-Sequenz 'GGCCCA[AT][AT][AT]' ist für seine Rolle in der Regulation verschiedener Wachstumsprozesse bekannt (Tab. 3.8 [308]). Bisher wurde jedoch keine direkte funktionelle Beziehung zwischen der Reaktion auf Hitzestress und diesem Motiv experimentell bestätigt. In dieser Analyse wurde zum ersten Mal ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Motiv UP1ATMSD und der Stressantwort gefunden (Tab. 3.10). In Tabelle 3.10 wurden ebenfalls weitere Funktionen dieses Motivs in der Modifizierung bzw. Transport von RNA-Molekülen sowie in verschiedenen Prozessen der Proteinmodifikation und der Ribosombiogenese identifiziert. Zusätzlich konnte diesem Motiv eine Rolle in bestimmten Entwicklungsprozessen nachgewiesen werden (Tab. 3.10). Das verstärkte Auftreten von Proteinen mit einer Rolle in der Erhöhung der strukturellen Integrität der Proteine und RNA lässt vermuten, dass diese Bindestelle eine solche Funktion unter Hitzestress ausübt.

Die TFBS SITEIIATCYTC ist für seine Rolle in der verstärkten Aktivität beim Aufbau der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung und Regulation der ribosomalen Proteine bekannt [334, 335, 317]. Der durch den Hitzestress verstärkte Elektronentransfer in der respiratorischen Kette ist einer der Gründe für den erhöhten Anteil an ROS-Elementen in der Zelle. Die funktionelle Zugehörigkeit erklärt die Akkumulation der Gene mit dieser Bindestelle unter Hitze. Dieses Motiv zeigt ein stressspezifisches Verhalten (Tab. 3.9). Die Gene mit einer solchen Sequenz im proximalen Promotorbereich weisen eine starke Beteiligung an verschiedenen Prozessen in der Regulation von RNA und Proteinen auf (Tab. 3.10). Gene mit diesem Motiv üben zusätzlich eine Funktion in der Reaktion der Pflanze auf Lichtveränderungen aus (Tab. 3.10). Das *cis*-regulatorische Bindestellenmotiv HEXAMERATH4 übt eine regulatorische Funktion bei der Genexpression der Histongene aus. Das ANAERO2CONSENSUS TFBS wurde in Genen des fermentativen Stoffwechselweges entdeckt [215]. Die Resultate dieser Arbeit weisen für Gene mit diesen Motiven im proximalen Promotorbereich eine explizite, regulatorische Funktion in der RNA-Modifizierung zu (Tab. 3.10). Die Gene in dieser Gruppe sind in der späteren Stressphase aktiv. Sie dienen möglicherweise als Verstärkung der Translationsprozesse bzw. sorgen für die Aufrechterhaltung der RNA-Modifizierungsprozesse (Tab. 3.7,

3.10). Gene mit den Proteinbindestellen MYBCOREATCYCB1 und CARGATCONSENSUS wurden bei verschiedenen zeitabhängigen Entwicklungsprozessen gefunden [247, 206, 116], das Motiv SURECOREATSULTR11 dagegen in Genen des Schwefelmetabolismus [195]. Die Gene in diesen beiden Bindestellengruppen wurden ebenfalls hauptsächlich in den späteren Zeitpunkten stärker aktiv (Tab. 3.9). In der Gensignaturanreicherungsanalyse wurden diesen Motivgruppen einer Funktion in der RNA-Modifizierung sowie in der Regulation der Proteinfaltung zugeordnet (Tab. 3.10). Die Gene mit dem MYBCOREATCYCB1 Motiv wurden bei der Reaktion auf Licht- und UV-Stressfaktoren und zusätzlich bei den Prozessen der Zellteilung überrepräsentativ gefunden. Das lässt sich durch die allgemeine, ubiquitäre Funktion der MYB-Transkriptionsfaktoren in mehreren regulatorischen und zellulären Metabolismen in der Pflanze erklären [234].

Bei der Überprüfung der Gene mit diesen Motiven in ihren proximalen Promotorregionen wurden biologische Funktionen überrepräsentativ identifiziert, deren Stoffwechselwege unter Hitze dereguliert wurden, wie z.B. Proteinfaltung oder -abbau oder RNA-Modifizierungsprozesse (Abb. 3.10 und Tab. 3.7). Für diese vier Motive konnte bisher noch keine Beziehung zum Hitzestress experimentell verifiziert werden. Die hier durchgeführte Computer-basierte Analyse zeigt eine eindeutige Zuordnung dieser DNA-Sequenzen zur pflanzlichen Reaktion auf Hitzestress.

Bei der Gruppe der herabregulierten Gene wurden weitere Proteinmotive mit einem hitzespezifischen Expressionsverhalten gefunden (Tab. 3.11). Eine direkte Verbindung zur Hitze wurde in früheren Experimenten bei keinem dieser Motive entdeckt. Vier der zehn Promotormotive wurden in ABA- und GA-kontrollierten Genen identifiziert, gehören also zur Gruppe der phytohormonregulierten Gene, die unter Hitzestress herabreguliert wurden. ABRELATERD1 und GADOWNAT werden durch die Anwesenheit von ABA aktiviert [323, 152], die Expression von Genen mit den Motiven DPBFCORED3 und GAREAT wird durch Gibberellinsäure kontrolliert [154, 233]. Die Gene mit dem ABRELATERD1-Motiv wurden überrepräsentativ in der späteren Stressphase akkumuliert (Tab. 3.11). Dies deutet auf deren mögliche Funktion in der Regulation photosynthetischer und weiterer energiemetabolischer Prozesse hin, die unter Hitze in der sekundären Stressantwort herabreguliert wurden (Tab. 3.12). Dieses Ergebnis untermauert die wichtige Rolle von ABA in der Regulation metabolischer Prozesse in der Pflanze als Reaktion auf den Stress [347, 33]. Die GADOWNAT-Gruppe wurde bei den temperaturabhängigen Stressfaktoren in den späteren Zeitpunkten identifiziert (Tab. 3.11). In Gengruppen mit einer Funktion in der Biosynthese der photosynthetischen Organelle wurde eine Anreicherung dieses Motivs wiedergefunden (Tab. 3.12). Dieses Verhalten liefert eine mögliche Erklärung für die Herabsetzung der Photosyntheserate in der späteren Hitzeantwort. Die Repression der Gene für die Chloroplasten verursacht eine Störung im Ablauf der Photosynthese, die wiederum zur Senkung des Energiemetabolismus führt.

Die weiteren hitzestressspezifischen Motive wurden überrepräsentativ bei Genen identifiziert, deren biologische Funktion dem Hitzestress nicht zugeordnet werden konnten. ANAERO1CONSENSUS und ANAERO2CONSENSUS werden dem fermentativen Stoffwechselweg unter anaerobischen Bedingungen zugeordnet [215]. Der unter anaerobischen Bedingungen bevorzugte Energieherstellungsweg, der Krebs-Zyklus, wird unter Hitze herabreguliert [160]. Es lässt sich deshalb vermuten, dass die Prioritäten weiterer Energiemetabolismen ebenfalls in den Hintergrund geraten. Die Motive L1BOXATPDF1 und Bellringer/replumless/pennywise, welche das Gen AGAMOUS regulieren, wurden Entwicklungsprozessen zugewiesen [332, 109, 24]. ABRERATCAL wurde bei Genen der ABA-abhängigen Ca^{2+} Regulation in der Pflanze identifiziert [142].

Diese drei Motive wurden in sämtlichen früheren Stressantworten gefunden (Tab. 3.11). Bei der Analyse der funktionellen Annotationen konnten diese drei Motive verschiedenen, unter Hitzebedingungen deregulierten, funktionelle Kategorien zugeordnet werden, z.B. Reaktion auf abiotischen Stress, Energie- oder Kohlenhydratmetabolismen (Tab. 3.12).

Das Motiv UPRMOTIFIIAT weist ungewöhnliche Resultate auf. Proteine mit diesem Motiv wurden bei Prozessen der Proteinfaltung entdeckt. In dieser Arbeit dagegen wurde eine Anreicherung von Genen mit dieser Domäne bei den herabregulierten Genen gefunden. Die UPR-Reaktion (**un**folded **p**rotein **r**esponse) wird im Endoplasmatischen Retikulum wegen der Akkumulation von ungefalteten Proteinen ausgelöst und wird durch Stress (unter anderem auch Hitzestress [40, 194]) verursacht. Zur Gruppe der UPR-Gene gehören unter anderem verschiedene Chaperone, BiP- und PDI-Proteine, welche bei der Proteinfaltung eine Rolle spielen, einer wichtigen biologischen Funktion unter Hitzestress. Der UPR-Stoffwechselweg wird durch verschiedene Phosphatasen negativ reguliert [336]. Dies führt unter anderem zur Verminderung des zellulären Wachstums, einem Phänotyp des Hitzestresses. Weitere Gene in dieser Gruppe gehören u.a. zu verschiedenen Sekundärmetabolismen und Zellwandmodifizierungsprozessen, welche unter Hitze gesenkt werden. Daraus lässt sich schließen, dass Gene mit diesem Motiv auch weitere Hitze-relevante Funktionen ausüben.

Eine Korrelation zwischen abiotischem Stress und bestimmten Proteindomänen wurde hier nachgewiesen. Sowohl für die hoch- als auch für die herabregulierten Gene wurden angereicherte Stress-spezifische, cis-regulatorische Bindestellen gefunden. Die Gene, welche diese Motive in ihrer proximalen Promotorregion beinhalten, gehören verschiedenen biologischen Klassen an und üben eine Vielzahl von Funktionen aus. Bisher sind nur wenige Promotorstellen in direkten Zusammenhang mit Hitze gebracht worden. In dieser Arbeit wurde eine Reihe weitere Transkriptionsfaktorbindestellen mit einer spezifischen Hitzestressregulation nachgewiesen. Die Ergebnisse in dieser Analyse weisen darauf hin, dass diese Motive ebenfalls wie die HSE-Elemente [81], einen Einfluss auf die Hitzestressregulation ausüben.

Die Veränderungen verschiedener Stoffwechselwege unter Hitzestress In dieser Analyse wies die Pflanze unter Hitzeeinfluss die größte Anzahl an differentiell regulierten Genen über alle Zeitpunkte hinaus sowohl für die hoch- als auch für die herabregulierten Gene auf (Tabelle 3.4). Hitze und Lichtstressfaktoren reduzieren die CO₂-Aufnahme in der Pflanze. Die Stomata werden geschlossen, um zu verhindern, dass die Pflanze zu viel Wasser verliert. Als Reaktion auf den Stress wurden in dieser Arbeit verschiedene, signifikant veränderte, metabolische Prozesse nachgewiesen. Der Calvinzyklus verlangsamt sich, die Photosyntheserate wurde reduziert und es entsteht eine Photoinhibition. An diesem Prozess sind u.a. die sog. reaktiven Sauerstoffelemente beteiligt. Pflanzen sind gut gerüstet, um gegen den photooxidativen Stress vorzugehen. Wie stark die Pflanze vom Stress betroffen wird, hängt von ihrer Fähigkeit ab, die ROS-Elemente abzubauen. Diese radikalen, sehr reaktiven Ionen mit einem ungepaarten Elektron werden bei der Respiration und der Elektronentransportkette unter Stress verstärkt produziert und können die DNA, RNA und Proteine schädigen [291, 212].

Da die ROS-Elemente gleichzeitig eine wichtige Signalfunktion bei verschiedenen Stoffwechselwegen ausüben, muss eine Balance zwischen deren Bildung und Bekämpfung in der Zelle existieren (Abb. 3.16). Damit dieses Gleichgewicht aufrecht erhalten werden kann, müssen regulatorische Prozesse für die Produktion der ROS-Elemente aktiviert werden. In Abb. 3.16 wurde das regulatorische Netzwerk der Produktion bzw. des Abbaus von reaktiven Sauerstoffelementen dargestellt. An diesem Prozess nehmen verschiedene Oxidasen teil (Glycolatoxidasen, Amineoxidasen, NADPH Oxidasen oder Kupferoxidasen) [212]. Zusammen mit Salicylsäure (SA) und Stickstoffmonoxid (NO) vermin-

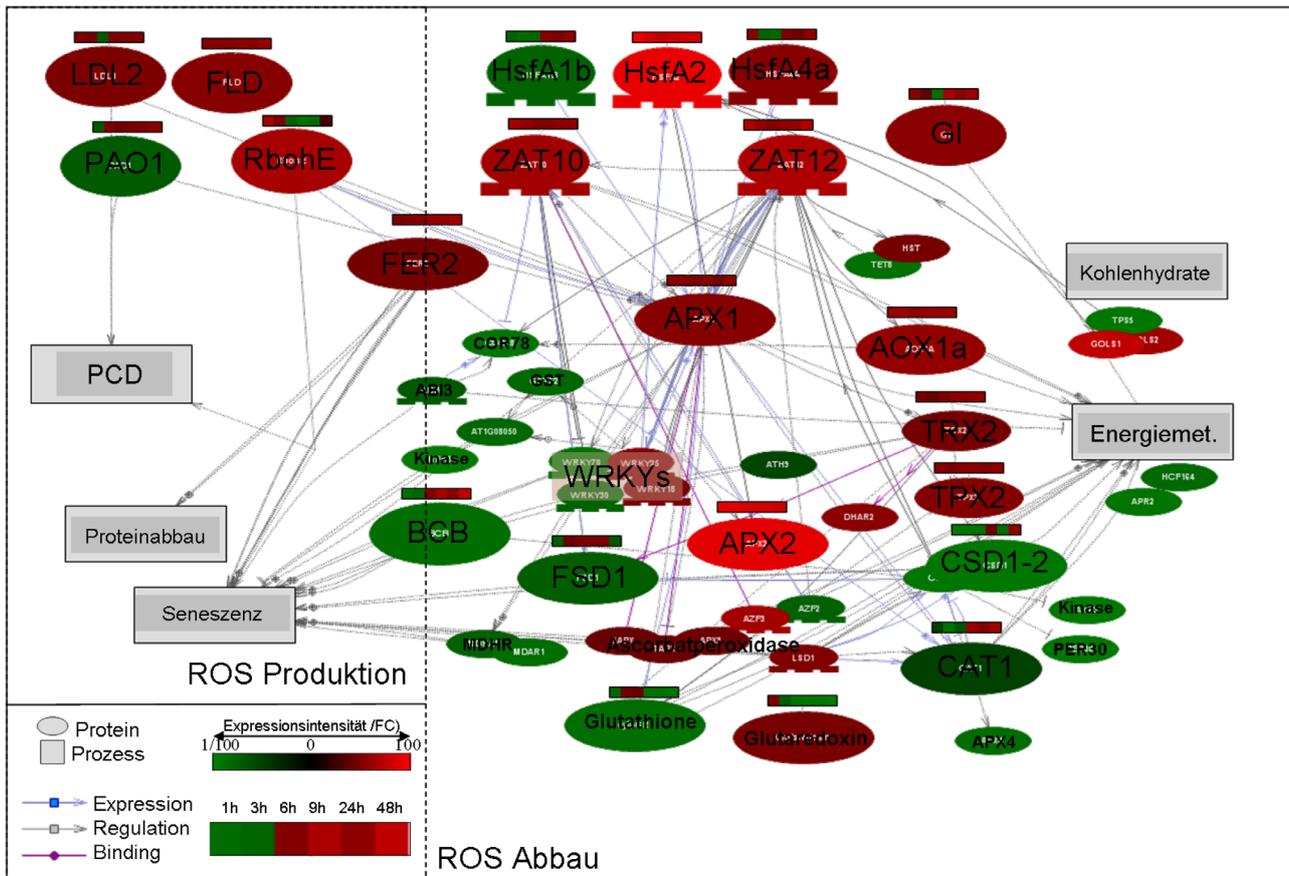


Abbildung 3.16: Die Regulation des ROS-Netzwerkes unter Hitzestress. Das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion durch verschiedene Oxidasen (LDL, FLD, PAO, etc.) und dem Abbau dieser giftigen Moleküle mittels antioxidativer Proteine und der Detoxifikation der Zelle muss aufrecht erhalten bleiben. Radikalfänger wie Peroxidasen, Thioredoxine, Glutathione, Catalase oder Superoxiddismutasen regulieren die Akkumulation dieser Sauerstoffradikale in verschiedenen Organellen. Weitere Transkriptionsfaktoren (ZAT-Proteine, GI oder WRKYs) beteiligen sich an der Regulation. Weitere Sekundärmetabolismen werden durch den Stress beeinflusst. PCD und das Abbauen falsch gefalteter Proteine nehmen zu, während metabolische Stoffwechselwege wie der Energie- oder Kohlenhydratmetabolismus herabreguliert werden. Abgebildet ist eine Momentaufnahme nach einer Stunde Stress. Die Heatmaps über ausgewählten Genen zeigen deren Expressionsverhalten im Verlauf der Analyse. Die Farbskala zeigt grün bei herabregulierten Genen und rot bei einer erhöhten Expression. Das Netzwerk wurde mit Hilfe der 'Pathway Studio' Software V. 6.2 erstellt [226, 11].

den diese die Aktivität von ROS-Fängern wie APX, CAT, oder SOD- Proteinen (Ab. 3.16) [155].

Andererseits besitzt die Pflanze mehrere Mechanismen für die Detoxifikation der Zellen. Als Reaktion auf Hitze wurden in der Zelle stressspezifische Hitzeschockfaktoren intensiver aktiviert. Als Folge dieser Aktivität wurden weitere von Hsf regulierte Gene stärker exprimiert. Die in den Chloroplasten entstehenden Sauerstoffradikale werden mit Hilfe verschiedener antioxidativer Gene wie z.B. APX1, CSDs, CATs und AOX reduziert. Die aufgrund des photooxidativen Stresses entstehenden Elektronen werden im PS-I vom Sauerstoff aufgefangen. Die erzeugten Hydroxid-Ionen und Wasserstoffperoxid werden im Wasser-Wasser-Zyklus durch Superoxiddismutase und Peroxidase zu Wasser reduziert. Die Regenerierung der beteiligten Peroxidasen übernehmen Glutathione mit NADPH Molekülen bzw. Monohydroascorbate [77, 92]. Wie in Abbildung 3.16 sichtbar ist, nehmen weitere Proteine beim Schutz vor den ROS-Elementen teil, wie z.B. die Superfamilie der Thioredoxine (TRX, TPX, GRX, PDI und GST) (Abb. 3.16). Dabei handelt es sich um Oxidoreduktasen, welche in der zellulären Redox-Homöostase involviert sind. [65]. Diese können einerseits die Peroxidasen durch Reduktion reaktivieren, andererseits dienen sie als Chaperonen beim Schutz der Proteine. Diese werden durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (HSfs, WRKYs ODER MYBs) reguliert [212, 13, 339] (Abb.

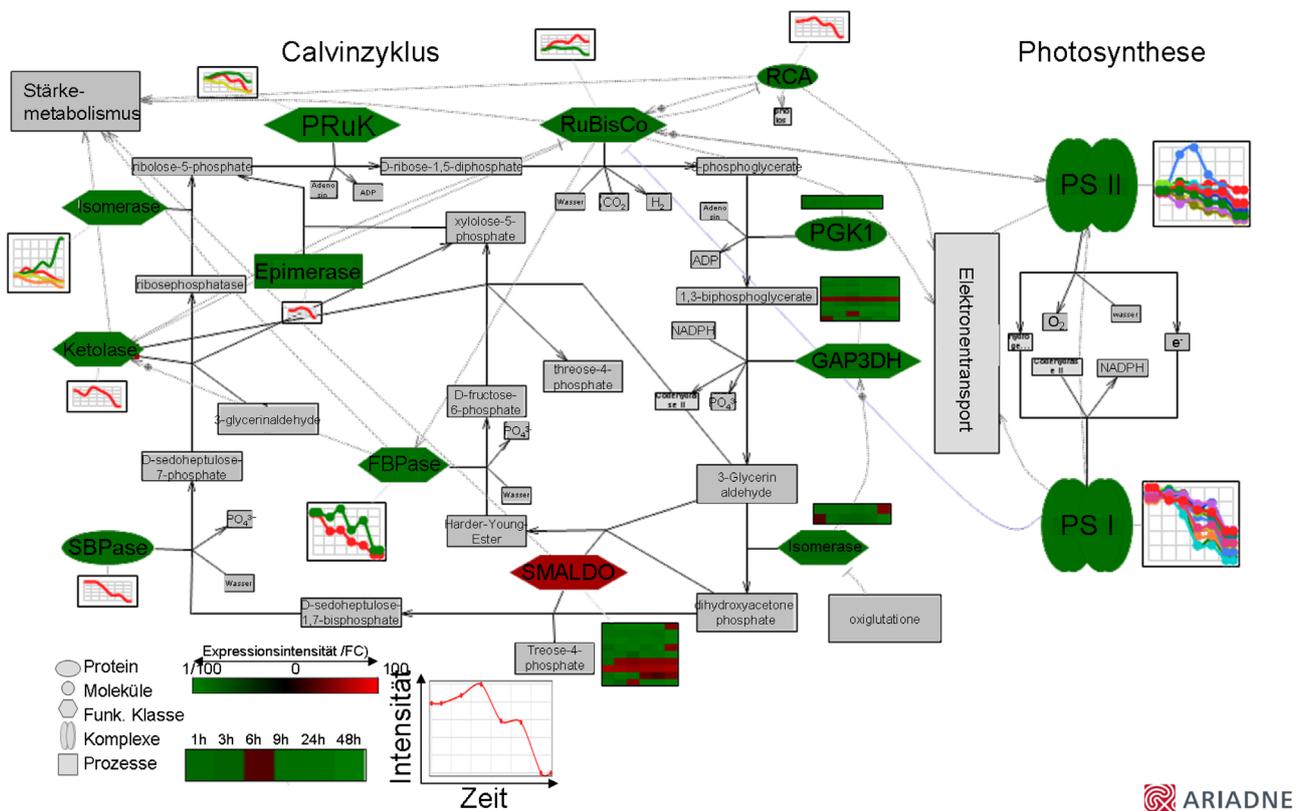


Abbildung 3.17: Einfluss der Hitze auf die Photosynthese und den Calvinzyklus. Durch Hitze werden die Gene in den Photosynthese-Reaktionszentren abgeschaltet. Während die Expression im PS-II relativ langsam reduziert wird, findet eine starke Herabsetzung der Gene in PS-I in den späteren Zeitpunkten statt. Die Reduktion von RuBisCo und Phosphoglyceratkinase verlangsamt den Calvinzyklus, wodurch überschüssige ATPs und NADPHs für die Degradierung der ROS-Elemente verwendet werden können. Durch die Schließung der Stomata und die Reduzierung der zellulären Kohlenstoffdioxidmoleküle werden die Regenerierungsschritte (Disproportionierung, Epimerisierung und Phosphorylierung) der RuBisCo-Moleküle verlangsamt. Das Netzwerk stellt die Expressionsintensität der Gene 48 Stunden nach Stressbeginn dar. Die Heatmaps und Liniendiagramme zeigen die Veränderungen in der Expressionsintensität während des Stressverlaufs. Das Netzwerk wurde aus dem 'Pathway Studio Software Paket' V. 6.2 entnommen [226, 11].

3.16).

Das Zinkfingerprotein ZAT12 reguliert die Expression von APX1, einer Ascorbatperoxidase (Abb. 3.16) [63]. Dieses Protein ist wiederum für die Hitzeresistenz unverzichtbar. Bei seiner Abwesenheit wird die Pflanze gegenüber oxidativem Stress sensibler und weist Wachstumsmissbildungen auf [209]. APX1 beteiligt sich an der Regulation weiterer Signalübertragungswege wie z.B. der Photosyntheserate oder des Kohlenhydratmetabolismus durch seinen Einfluss auf das GIGANTEA Protein (Abb. 3.16) [165].

Ein Resultat steigender Temperaturen ist die Schließung der Spaltöffnungen. Dadurch versucht die Pflanze, ihren Wasserverlust zu reduzieren. Weil die Verbindung nach außen gekappt wird, reduziert sich die CO_2 -Aufnahme. Aus diesem Grund wird der Energiemetabolismus unter Hitze herabreguliert. Einen der Kontrollmechanismen bilden die ROS-Elemente. Aus Abbildung 3.17 wird ersichtlich, wie der Hitzestress die Photosynthese unterdrückt. Mehrere Gene der Photosysteme I und II werden als Reaktion auf Hitze herabreguliert. Die molekularen Komplexe und funktionellen Klassen beinhalten mehrere Gene, die eine Verbindung eingehen und nur zusammen eine ähnliche zelluläre Funktion ausüben.

Die photochemische Aktivität des PS-II wird durch den Protonengradienten im Thylakoid reguliert. Das Ausmaß dieses Gradienten hängt von der Turnover-Rate des zellulären ATP ab. Diese

wiederum ist von der Aktivität der photosynthetischen Prozesse in der Pflanze (Photorespiration, Stickstoff- und Schwefelassimilierung) abhängig. Wie in Abbildung 3.17 sichtbar ist, wurden diese Prozesse aufgrund des Hitzestresses herabreguliert. Die Funktion der durch Licht aktivierten Enzyme des Calvinzyklus wurden unter Hitze ebenfalls herabreguliert, damit die Menge an ROS-Elementen im Bereich der kontrollierbaren Konzentration bleibt. TRX-Proteine, welche durch ROS-Elemente beeinflusst werden, regulieren den Verlauf dieses Prozesses und senken dessen Aktivität (Abb. 3.17) [207].

Die Verlangsamung des Calvinzyklus hat zur Folge, dass die Pflanze mehr NADPH (z.B. Thioredoxine oder Glutathione) für die ROS-Detoxifikation zur Verfügung hat [230, 260]. Die Genexpressionsintensität der Rubisco activase (RCA), eines wichtigen Enzyms für die Aktivierung des RuBisCo Komplexes, wurde in dieser Analyse durch den Hitzestress gesenkt (Abb. 3.17). Hitzestress inhibiert dessen Funktion, was zur Deaktivierung des Calvinzyklus führt.

Verschiedene Gene des Calvinzyklus, deren Expression aufgrund des Hitzestresses reduziert wurden, sind an der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus beteiligt. Wie in Abbildung 3.17 und 3.18 zu sehen ist, führt die Senkung ihrer Aktivität zur Herabregulierung der Stärkebiosynthese sowie weiterer metabolischer Prozesse der Kohlenhydratproduktion. Glukose und weitere Kohlenhydrate werden als Folge der Photosynthese und des Calvinzyklus synthetisiert. Diese Energie wird in Form von Stärke oder Lipiden in der Zelle gespeichert. Mit der Senkung dieser Prozesse wird auch die Produktion der Kohlenhydrate schwächer. Mehrere Proteine des Calvinzyklus beteiligen sich an der Regulation des Stärkemetabolismus. Das Rubisco-Gen besitzt eine zentrale Funktion sowohl im Calvinzyklus als auch in der Regulation der Kohlenhydratbiosynthese. Die RCA ist für den ersten Schritt der Kohlenstofffixierung im Calvinzyklus zuständig. Ketolasen beschleunigen die Produktion der Ribophosphatasen aus D-Sedoheptulose-7-Phosphat. Dies wird durch die Spaltung eines 3-Glycerinaldehydmoleküls eingeleitet. Wie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, wurden im Verlauf des Calvinzyklus mehrere Gene aufgrund des Hitzestresses herabreguliert. Als Reaktion auf die Aktivitätsinhibierung des Rubisco-Gens aufgrund des Hitzestresses wurden die Stärkebiosynthese im Chloroplast sowie weitere Prozesse des Kohlenhydratmetabolismus reduziert (Abb. 3.18).

Kohlenhydrate beteiligen sich an vielen verschiedenen Metabolismen in der Pflanze. Entwicklungs- und Wachstumsprozesse brauchen Sucrose, Cellulose hilft bei der strukturellen Integrität der Zelle und Stärke wird als Energiespeicher verwendet. Die Stoffwechselwege der Energie- und Kohlenhydratmetabolismen sind miteinander verknüpft und werden gegenseitig reguliert. Die Einwirkung von Hitzestress führt zur Energiereduzierung in der Zelle, wodurch die zelluläre Stärkekonzentration sinkt (Abb. 3.18).

Eine weitere Gruppe von Prozessen, die durch Hitzestress dereguliert wurden, ist die der hormonbedingten Metabolismen. Phytohormone beteiligen sich an verschiedenen zellulären Signalprozessen. Sie regulieren das Wachstum und verschiedene Entwicklungsmetabolismen. Auxin fungiert als Signalmolekül in mehreren verschiedenen Prozessen, wie z.B. der Zellteilung, der Rosetten- oder Blütenreifung, der Wurzel- oder Hypokotylentwicklung [61, 162, 198, 222], aber auch in anderen metabolischen Prozessen mit oder ohne der Beteiligung weiterer Signalmoleküle [23, 358]. Auxine dienen als Transkriptionsregulatoren. Sie binden an AUX/IAA-Proteine und markieren sie für den Abbau. Das F-Box Protein TIR1 gehört zum Ubiquitin-Ligase-Komplex. Dieser Auxinrezeptor identifiziert spezifische IAA-Repressoren für die Ubiquitination. Um das zelluläre Wachstum zu verlangsamen und die Entwicklung der Pflanze zu kontrollieren, werden mehrere Gene im Auxinsignalweg unter Hitze herabreguliert (Abb. 3.19). Hierdurch kann die aufgrund der Einwirkung des Hitzestresses geringere gespeicherte Energie für die Akklimatisierungsprozesse verwendet werden.

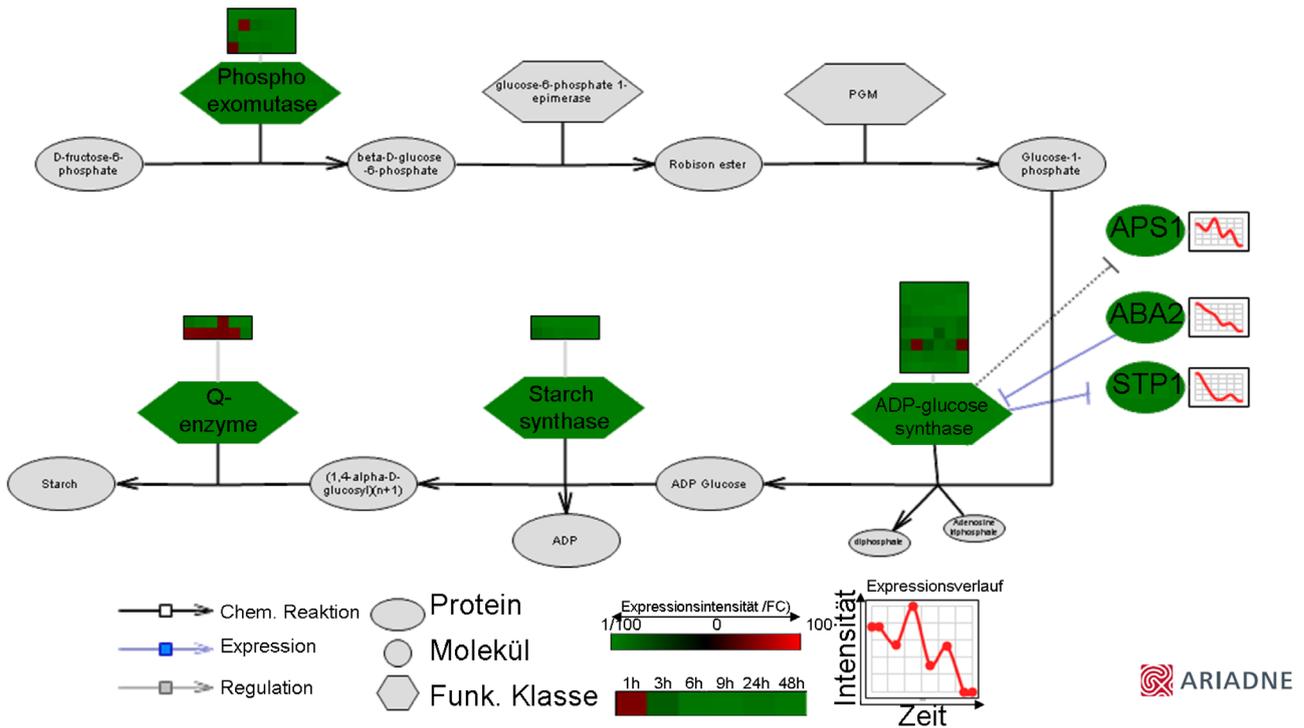


Abbildung 3.18: Genexpressionsveränderungen des Stärkemetabolismus während Hitzestress. Die Gene der Stärk biosynthese werden unter Hitzestress herabgesetzt. ABA und Zucker regulieren diesen Metabolismus. Die Repression der Glykosyldonor ADP-Glucose Synthase verursacht die Herabsetzung der Starch synthase Konzentration in der Zelle. Die abgebildeten Elemente zeigen die Intensität nach 48 Stunden an. In den Heatmaps und Liniendiagrammen kann der komplette Verlauf über alle Zeitpunkte beobachtet werden. Das Netzwerk wurde aus dem 'Pathway Studio Software Paket' V. 6.2 entnommen [226, 11].

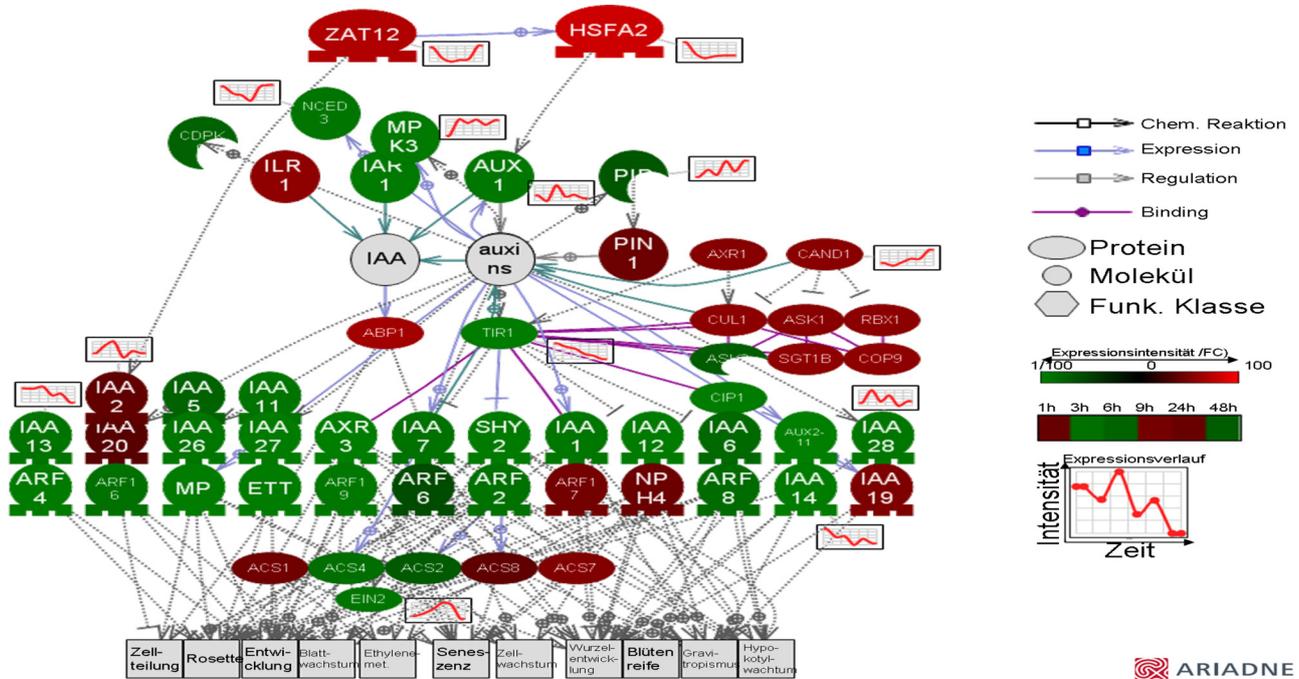


Abbildung 3.19: Regulation der Auxin-abhängigen metabolischen Stoffwechselwege unter Hitze. Hitze reguliert alle Bereiche der pflanzlichen Auxin-Biologie, die Synthese von Indol-3-Essigsäure (IAA), den Zell-Zell-Transport von IAA Molekülen (z.B. PIR als Efflux) und den TIR-Komplex Signalweg. Verschiedene metabolische und Entwicklungsprozesse werden durch Auxin beeinflusst. Hitzeschockfaktoren regulieren die Expression sowohl von Auxin-induzierten Genen (AUX1, IAR1) als auch Genen für die Ubiquitinierung von Auxin (TIR1, ASK1, CAND1). Das Netzwerk wurde aus dem 'Pathway Studio Software Paket' V. 6.2 entnommen [226, 11].

Wie im Auxinsignalübertragungsweg abgebildet wurde (Abb. 3.19), regulieren auxinabhängige Gene (AUX1, IAA, ARF, etc.) mehrere Entwicklungsprozesse [147]. Diese wurden durch die Inhibierung von auxinmetabolischen Vorgängen abgeschaltet. IAA-Proteine (Indol-3-Essigsäure) bilden Dimere mit den ARF-Proteinen (Auxin Responsive Factors) und inhibieren so deren Aktivität. Auxin trennt die beiden Moleküle voneinander, wobei die ARFs anschließend an die Promotoren der auxinabhängigen Gene binden und diese aktivieren. Hitzestress induziert die Expression der IAA-gesteuerten Proteine und verringert die Aktivität der ARF-Proteine (Abb. 3.19), wodurch der Auxinsignalweg und alle davon abhängigen Prozesse herabreguliert werden. Abbildung 3.19 zeigt die Komplexität bzw. die Vielfalt an Prozessen, bei denen Auxinmoleküle eine regulatorische Rolle ausüben. Während die meisten IAA-Gene herabreguliert wurden, zeigen andere eine erhöhte Expressionsintensität (z.B. IAA2, IAA19). Das lässt vermuten, dass diese Gene andere Prozesse kontrollieren wie z.B. die Seneszenz, welche unter Hitze verstärkt auftritt. Das Expressionsverhalten von auxinregulierenden Transkriptionsfaktoren (HSFA2, ZAT12) zeigt eine frühe intensive Reaktion, gefolgt von einer sofortigen Senkung der Expressionsintensität im nachfolgenden Zeitpunkt. Am Auxinsignalweg nehmen viele Gene mit unterschiedlichen Verhaltensmuster teil. Die Gene mit einer Funktion in den Wachstumsprozessen wie z.B. IAA11 oder IAA27 wurden durch den Stress herabreguliert. Gene mit einer hemmenden Funktion im Auxinsignalweg (z.B. CAND1) weisen eine kontinuierlich steigende Expressionsintensität im Stressverlauf auf (Abb. 3.19). CAND1 besteht aus HEAT-Wiederholungen, wie für die Assemblierung und Abbau des SCF-Proteinabbaukomplexes zuständig sind [50]. Die IAA/AUX-Proteine werden von diesem Proteinkomplex als Substrat erkannt und degradiert.

Hohe Temperaturen verursachen eine umfangreiche und aufwendige Umstrukturierung im pflanzlichen Metabolismus. In Tabelle 3.13 wurden weitere Prozesse mit einigen dazugehörigen Schlüsseln aufgelistet, die unter Hitze hoch- bzw. herabreguliert wurden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen die Resultate früherer Experimente [213, 148]. Die Konzentration der ROS-Elemente oder der Proteine zur Beseitigung von falsch gefalteten Proteinen sowie zu deren Schutz steigen als Reaktion auf den Stress schnell und stark. Lang anhaltender Stress verringert die Photosyntheserate und senkt den Kohlenhydratmetabolismus. Die Elektronentransportkette wird durch die Verringerung der Photosyntheserate nicht verändert. Dies führt zu einem Konzentrationsanstieg der freien Elektronen und dadurch der ROS-Elemente. Der oxidative Stress steigt.

Weitere Resultate in dieser Arbeit geben neue Erkenntnisse in verschiedenen Bereichen der pflanzlichen Stressantwort. Phytohormone z.B. beteiligen sich an der Regulation mehrerer zellulären Prozesse. Viel ist bereits über die Regulation von ABA oder Ethylene unter Stressbedingungen erforscht worden. Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Auxin- und etwas schwächer auch die Gibberelinkonzentration vom Stress beeinflusst werden. Der Einfluss der Hitze auf die Ribosomenbiogenese oder die Veränderungen des Histonmetabolismus ist ebenfalls noch nicht geklärt. Obwohl die genaue Rolle der Histon-Acetyltransferasen (HAT) bzw. -Deacetylasen (HDAC) noch nicht ganz geklärt wurde, deuten die Resultate in dieser Arbeit auf deren Rolle in der Regulation der Stressantwort in der Pflanze hin. Die Histone halten die DNA-Struktur zusammen. Die Deregulation der Deacetylasen und Acetyltransferasen beeinflusst direkt die Translations- bzw. Transkriptionsprozesse. Die Expressionserhöhung der HDAC-Proteine führt zur Reduktion der Transkriptionsrate aufgrund der Hitzestresseinwirkung. Dadurch wird die Transkriptionsrate gesenkt. Um festzustellen, welche Prozesse für diese Herabregulierung zuständig sind, bzw. welcher Einfluss diese Reaktion auf die pflanzliche Stressantwort hat, sind weitere Experimente nötig.

Stoffwechselweg	Gene	Zeitpunkt					Literatur
		1h	3h	6h	9h	24h	
ROS Produktion	RbohE	■	■	■	■	■	Apel, K. [9]
	FLD	■	■	■	■	■	Meda, R. [200]
ROS Abbau	APX2	■	■	■	■	■	Mitler, R. [212]
	AOX1A	■	■	■	■	■	Mitler, R. [212]
	CAT1	■	■	■	■	■	Miller, G. [209]
Elektronentransportkette	Cytochrome C reductase	■	■	■	■	■	Zahng, R. [357]
	NADH-Dehydrogenase	■	■	■	■	■	Zahng, R. [357]
Ribosombiosynthese	RPL4	■	■	■	■	■	Tarifa, Y. [307]
	RPS11	■	■	■	■	■	Lenvik, T.R. [169]
Spleißen	Spleißfaktoren (z.B.SRP30)	■	■	■	■	■	
Proteinabbau (Ubiquitination)	UBA	■	■	■	■	■	Jenks, M [135]
	UBC	■	■	■	■	■	Feussner, K. [72]
	UBP	■	■	■	■	■	Yan, N. [353, 246]
oxidative Phosphorylierung	Cytb	■	■	■	■	■	Zahng, R. [357]
Fettsäuremetabolismus	FAD3	■	■	■	■	■	Qin, M. [253]
	ADS1	■	■	■	■	■	Larkindale, J. [167]
Tetraterpenoidbiosynthese	ZEP	■	■	■	■	■	Larkindale, J. [167]
Phenylalaninbiosynthese	PAL2	■	■	■	■	■	
Schwefelbiosynthese	FRY1	■	■	■	■	■	
	APS2	■	■	■	■	■	
	APK	■	■	■	■	■	
Stickstoffbiosynthese	GDH	■	■	■	■	■	
	ASN2	■	■	■	■	■	
Histonemetabolismus	Histone H2B	■	■	■	■	■	
	Histone H3	■	■	■	■	■	
	Histone H4	■	■	■	■	■	
Glykolyse	PPC1	■	■	■	■	■	
	PCK1	■	■	■	■	■	
	PDHC	■	■	■	■	■	
Raffinosebiosynthese	GOLS1	■	■	■	■	■	Panikulangara et al. [238]

Tabelle 3.13: Veränderungen der pflanzlichen Stoffwechselwege aufgrund des Hitzestresses. Hitzestress reguliert mehrere metabolische Prozesse neu. Die Synthese zellulärer Strukturen wie der Ribosomen oder Histone wird aufgrund des Stresses geändert. Während die Pflanze den Anstieg der ROS Konzentration und die unterbrochene Elektronentransportkette ohne weitere Zufuhr von CO₂ zu bewältigen hat, werden sekundäre Metabolismen reduziert (Energie, Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren usw.).

Die Genexpressionsveränderungen in der pflanzlichen Hitzestressantwort in Abhängigkeit von der Zeit In der Zeitreihenanalyse wurden Gene identifiziert, deren Expressionsverhalten sich in Abhängigkeit vom Zeitfaktor signifikant ändert. Die gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, metabolische Stoffwechselwege und die regulatorischen Beziehungen zwischen den einzelnen teilnehmenden Genen besser zu erklären.

Wie in der gewichteten Spektralanalyse abgebildet wurde (Abb. 3.20), lässt sich die Hitzestressantwort in eine frühere (1h-3h), mittlere (6h-9h) und spätere (24h-48h) Phase unterteilen. Mit 18% weist der Zeitfaktor den größten Einfluss auf die Expressionsunterschiede zwischen den behandelten Experimenten und den Kontrollgruppen auf. Mehrere Faktoren zeigen bereits nach der ersten Messung eine 10-100fache Expressionsintensivierung im Vergleich zur Kontrolle. Abbildung 3.21.A zeigt das Expressionsverhalten einiger früh-exprimierten HSPs sowie weiterer wichtiger Gene in der Hitzestressregulation. Die Hsfs (z.B. HsfA2 \geq 190fach oder HsfB1 \geq 50fach) reagieren auf den äußeren Reiz,

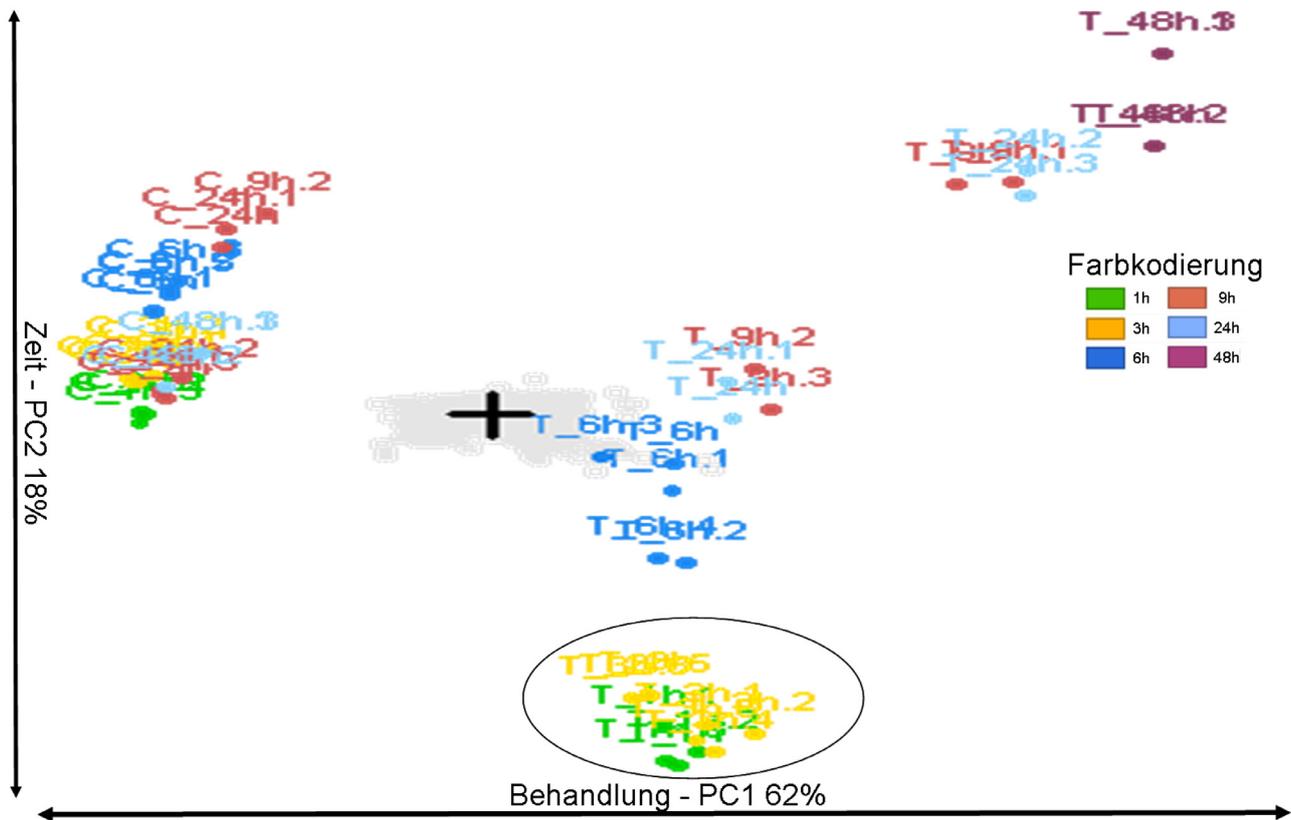


Abbildung 3.20: Spektral-Map Analyse der Hitzestressexperimente. Die grauen bzw. schwarzen Kreise stellen die Gene dar. Die farbigen Rechtecke stehen für die unterschiedlichen Experimente. Die Symbolgröße ist proportional zum absoluten Expressionswert der Gene bzw. Experimente. Die Kontrollexperimente aller Zeitpunkte wurden in einer Gruppe zusammen geclustert. Die behandelten Experimente der Zeitpunkte 1h und 3h wurden separat unterhalb der restlichen Experimente gruppiert. PC1 und PC2 sind jeweils die erste und zweite Komponente der Reduktion in der Multivarianteanalyse.

aktivieren unter anderem verschiedene HSPs (Abb. 3.21), die wiederum an weitere Promotormotive binden. Dadurch entfaltet sich die Stressreaktion und weitere abwärts geschaltete Gene werden in unterschiedlichen Signalkaskaden im Verlauf der Zeit aktiviert (Abb. 3.21.B). In dieser früheren Phase wurden mehrere Transkriptionsfaktoren schnell und intensiv exprimiert. In dieser Phase reagiert die Pflanze auf den allgemeinen Stress, bevor die Signalkaskade in stressspezifische Prozesse umgeschaltet wird. In dieser Phase findet man aber bereits den Anfang der stressspezifischen Antwort, welche die Regulation verschiedener Metabolismen zum Schutz der Pflanze übernimmt.

In der späteren Phase sind bereits mehrere Signalkaskaden aktiv und eine breit aufgefächerte metabolische Veränderung findet statt. Ein gutes Beispiel dafür ist die Regulation des HsfA3 durch das DREB2A-Protein [275]. In Abbildung 3.21 wird diese Aktivierung durch die Verschiebung des Expressionsverhaltens deutlich. Bisher unbekannte Hsfs binden an die Promotorsequenz des DREB2A-Proteins. Die transkribierten DREB2A-Elemente binden anschließend an die DRE-Elemente in der proximalen Promotorregion des HsfA3-Gens und regulieren so dessen Expression. Die Ergebnisse der Spektralanalyse (Abb. 3.20) lassen sich mittels des SAM Algorithmus bestätigen (Signifikante Analyse der Microarrays, ([319])). Die SAM-Analyse wurde mit einem Schwellenwert der falsch gefundenen signifikanten Gene (FDR) ≥ 1.0 durchgeführt. Die Suche nach signifikanten Genen in den einzelnen Zeitpunkten hat in dieser Arbeit gezeigt, dass die größten Differenzen nach sechs Stunden auftritt. In den ersten Messpunkten wurden hauptsächlich Gene für die Reaktion auf Hitze und weitere Stressfaktoren mit einer ähnlichen Wirkung (Licht, UV, oxidativer Stress) signifikant dere-

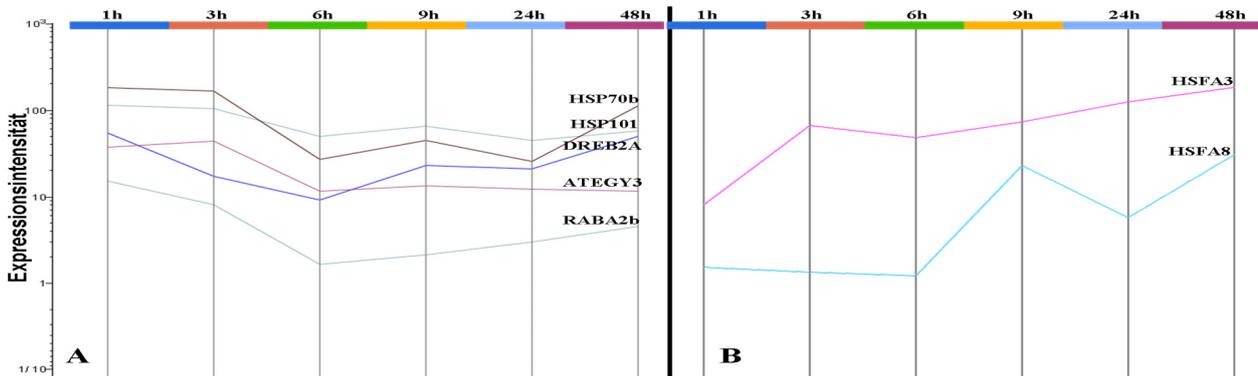


Abbildung 3.21: Zeitabhängiges Expressionsverhalten von Biomarkern unter Hitze. Die Aufteilung der Stressantwort in eine frühere (A) und eine spätere Reaktion (B) korreliert mit der Expression verschiedener Hitze-Biomarkern. Die Gene der spezifischen Reaktion werden in den ersten zwei Zeitpunkten exprimiert. Anschließend werden sie herabreguliert. Die Gene der allgemeinen Stressantwort werden später aktiviert.

steigende Expression		sinkende Expression	
Funktion	Anzahl der Gene	Funktion	Anzahl der Gene
Aminosäuremetabolismus	3	Aminosäuremetabolismus	31
Kohlenhydratmetabolismus	4	Kohlenhydratmetabolismus	35
Zelluläre Organisation und Zellwandmodifizierung	5	Zelluläre Organisation und Zellwandmodifizierung	38
Entwicklungsprozesse	3	Entwicklungsprozesse	21
DNA Metabolismus (TF)	9	DNA Metabolismus (TF)	48
Energiemetabolismus	3	Energiemetabolismus	51
Hormonmetabolismus	1	Hormonmetabolismus	23
Proteinabbau	19	Lipid metabolism	26
Proteinmodifizierung	11	Cofaktorenmetabolismus	10
Transport	6	Nukleotidmetabolismus	7
RNA Prozesse	10	Proteinabbau	35
Sekundärmetabolismus	1	Proteinmodifikation	57
Signalwege	7	RNA Modifikation	23
Stressantwort	2	Sekundärmetabolismus	32
Unbekannt Funktion	84	Signalwege	40
		Stressantwort	24
		Transport	47
		Xenobiotischer Metabolismus	2
		Unbekannte Funktion	50

Tabelle 3.14: Funktionelle Kategorien der transient deregulierten Gengruppen unter Hitzestress. Diese Gruppen wurden bei der Analyse des Expressionsverhaltens mittels SAM-Analyse gefunden [319]. Gene mit einem konstanten Expressionsverhalten über alle Zeitpunkte wurden in deren biologische Funktionen unterteilt. Die Tabelle zeigt die Gruppen mit einer konstant erhöhten bzw. sinkenden Expressionsintensität. Die hervorgehobenen Gruppen besitzen durchschnittlich deutlich mehr Gene im Vergleich zu den anderen in derselben Kategorie. Diese biologischen Funktionen werden in Abhängigkeit von der Zeit stärker vom Stress beeinflusst als die anderen Gruppen.

guliert. Dagegen wurde nach sechs Stunden eine Auffächerung der Stressantwort erkannt. Während die spezifische Hitzestressantwort nicht ganz nachgelassen hat, kommen auch weitere metabolische Prozesse und strukturelle Komponenten hinzu, z.B. Energie- bzw Kohlenhydratmetabolismen oder die Biosynthese von Sekundärmetaboliten.

Mit dem SAM-Algorithmus wurde die Expression im kompletten Stressverlauf über alle Zeitpunkte untersucht. Zwei Verhaltensmuster wurden in der Stressantwort analysiert. Gene, deren Expression eine steigende bzw. sinkende Tendenz im Experimentsverlauf aufweisen und solche mit einer transienten Expression, also solcher mit einem Expressionsmaximum bzw. -minimum mitten im analysierten Zeitverlauf ([319, 224]). Bei der Analyse der spezifischen Tendenzen wurden die Gene in bestimmte biologische Funktionen unterteilt. Tabelle 3.14 stellt die Kategorien dar, welche in dieser Analyse identifiziert wurden. In der zweiten Analyse wurden die einzelne Zeitpunkte miteinander verglichen. Hier wurde nach Genen gesucht, deren Expression zwischen zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten signifikant dereguliert wurden (LIMMA, [293, 294]). In der Gruppe der konstant stei-

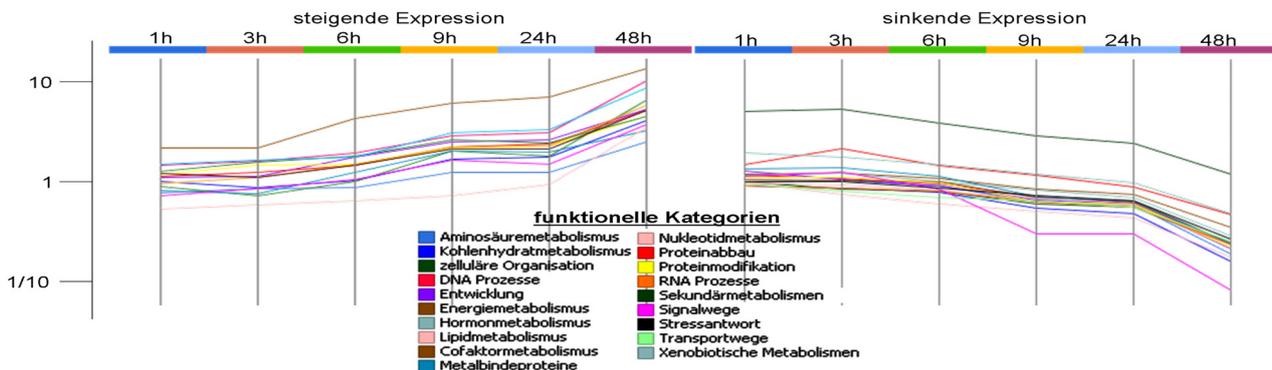


Abbildung 3.22: Zeitabhängiges Expressionsverhalten der Gene unter Hitzestress. Gene, deren Expression kontinuierlich steigt (links) bzw. sinkt (rechts) wurden nach deren funktionellen Kategorien unterteilt. Abgebildet wurden die gemittelten Expressionswerte der jeweiligen biologischen Funktionen in allen Zeitpunkten.

genden Genexpression wurden die Prozesse für die RNA-, Proteinmodifizierungen und deren Abbau überrepräsentativ identifiziert (Tab. 3.14). Zusätzlich weisen verschiedene Transkriptionsfaktoren eine steigende Expressionsintensität auf. Gene der RNA- und DNA-Modifizierungsprozesse wurden hier erwartet. Aufgrund des länger andauernden Stresses erhöht sich die zelluläre Transkriptions- bzw. Translationsaktivität. Der Hitzestress verstärkt die Akkumulation von falsch- bzw. ungefalteten Proteinen. Der signifikant größere Anteil der Gene mit einer Schutz- (Chaperone) oder Abbaufunktion (Ubiquitine) wurde hier ebenso entdeckt. Zu den Genen des Energiemetabolismus gehört u.a. eine NADPH-Dehydrogenase (ATMG00510), welche bei der oxidativen Phosphorylierung aktiv ist. Ein weiterer Grund für die Steigung der NADH-Dehydrogenase könnte der auf den Hitzestress folgende oxidative Stress sein. Durch die Hitze schließen sich die Spaltöffnungen. Dadurch wird die Photosynthese verlangsamt. Elektronen werden weiterhin freigesetzt und die Elektronentransportkette arbeitet ununterbrochen weiter. In der Zelle wurden ROS-Elemente akkumuliert, die zum Teil abgebaut werden müssen, um den Zelltod zu verhindern. Das erklärt die Identifizierung eines Cytochroms b5, der bei der Zellentgiftung mitwirkt. Die Genfamilie der Dehydrogenasen spielt eine wichtige Rolle im Elektronentransport. Ein weiteres Gen in dieser Gruppe ist ein Mitglied der Thioredoxinfamilie, welche für den Abbau der ROS-Elemente verwendet wird. Endomembran-Transportgene wurden stärker exprimiert, weil der zelluläre CO_2 -Level steigt. In der Kategorie der Signalproteinen wurden Gene gefunden, deren Expression aufgrund der H_2O_2 -Konzentrationserhöhung aktiviert wurden.

Die Analyse hat ergeben, dass die pflanzliche Stressantwort wesentlich mehr herabregulierte Gene als solche mit einer erhöhten Expression beinhaltet (Tab. 3.4). Bei der Analyse der signifikant deregulierten Gene mit einer kontinuierlich sinkenden Expressionsintensität wurden über 600 Gene wiedergefunden. Die Zuordnung dieser Gene zu deren funktionellen Kategorien wurde in Tabelle 3.14 aufgelistet. Gene aus verschiedenen sekundärmetabolischen Prozessen kommen in dieser Gruppe häufig vor. Diese Funktionen weisen unter Hitze eine schwächere Aktivität auf. In diesen Gruppen befinden sich mehrere Transkriptionsfaktoren aus den Familien der bZIP, MYB, bHLH und der Zinkfingerproteinfamilie C2H2. Sie kontrollieren mehrere regulatorische Prozesse wie z.B. den Energiemetabolismus oder den Kohlenhydratmetabolismus. Die Senkung dieser Faktoren liegt möglicherweise an der Herabsetzung der von ihnen regulierten metabolischen Prozesse. Zu dieser Gruppe zählen interessanterweise auch Gene für den Proteinabbau. Die Expression dieser Gene wurden hauptsächlich in den späteren Zeitpunkten herabgesetzt (Abb. 3.22).

In der Gruppe der herabregulierten Gene befinden sich Gene der Reaktionszentren beider Pho-

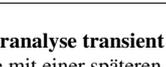
Nr.	Anzahl	Expressionsmuster	angereicherte biologische Funktionen
1	502		Metabolische Prozesse - Energie, Aminosäure; zelluläre Organisation
2	153		keine auffällige Überrepräsentation bestimmter Funktionen
3	75		abiotischer Stress (Hitze, Licht), Reaktion auf ROS-Elemente
4	521		Reaktion auf Lichtsignale
5	144		Reaktion auf Hitze, Licht, oxidativen Stress; Proteinfaltung
6	128		keine auffällige Überrepräsentation bestimmter Funktionen
7	132		keine auffällige Überrepräsentation bestimmter Funktionen

Tabelle 3.15: Clusteranalyse transient exprimierten Gene unter Hitze. Die Gene wurden in sieben Expressionscluster unterteilt. Die Clusters 1,4 und 6 enthalten Gene mit einer späteren erhöhten Aktivität. Die Gene in den Clustern 3 und 5 dagegen wurden früh stark exprimiert. Sie wurden im späteren Stressverlauf herabreguliert. Diese Gene gehören zur spezifischen (abiotischen-) Hitzestressantwort. Die K-Means Analyse wurde mit einer positiven Korrelationsmatrix errechnet [101]. Die überrepräsentativen biologischen Gruppen wurden mittels Fisher's Exact Test auf die entsprechenden GO-Annotationen identifiziert [75, 311]

tosysteme, die aufgrund des Stresses herabreguliert wurden, mehrere Cytochrome P450 und deren Reduktasen, welche an mehreren metabolischen und strukturellen Prozessen (oxidativen Reaktionen) beteiligen sind sowie verschiedene Pyrophosphorylasen, die eine Funktion in der Sukrose bzw. Stärkebiosynthese ausüben. In Abb. 3.22 wurden die gemittelten Expressionswerte jeder biologischen Funktion in den konstant steigenden (A) sowie sinkenden (B) Gengruppe abgebildet. In der Analyse wurden lediglich die Gene identifiziert, welche eine fortlaufende Expressionsänderung zeigten. Eine Intensitätsdifferenz von einer Zehnerpotenz in beiden Gruppen ist deutlich sichtbar. Dieses Verhalten zeigt, wie umfangreich und kontinuierlich die Umgestaltung der pflanzlichen Stressantwort auf Hitze stattfindet.

In der zweiten Analyse wurde das Verhalten transient exprimierter Gene untersucht (SAM, [319]). Mittels einer k-Means Analyse wurden die Gene mit einer maximalen Expressionsintensität im mittleren Zeitbereich der Stressbehandlung nach deren Expressionsmuster gruppiert (Tab. 3.15 [101]). Cluster 1, 4 und 6 weisen eine positive Tendenz auf. Im ersten Cluster wurden mehrere Gene aus metabolischen Prozessen identifiziert, die in den späteren Zeitmessungen differentiell reguliert wurden (Tab. 3.15). Dagegen wurde in den Clustern 3 und 5 in dieser Tabelle eine intensive Anfangsphase beobachtet. Die Gene in diesen Clustern gehören zur Gruppe der abiotischen Stressantwort (Hitze, Licht oder oxidativer Stress) und der Reaktion auf ROS-Elemente. Es wurde hier gezeigt, dass die erste spezifische Stressantwort, mit der die Pflanze beim Stressbeginn startet, deren direkten Schutz beinhaltet. Als Erstes wurden die Chaperone mit einer Schutzfunktion der Proteinfaltung und die Proteosom bzw. Ubiquitine für die Entsorgung falsch gefalteter Proteine exprimiert. Die spätere Expression enthält Gene der metabolischen Prozesse wie Photosynthese, Lipidmetabolismus, sowie der zellulären Organisation.

Ein weiterer zeitabhängiger Algorithmus analysiert die Expressionsunterschiede zwischen zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten. In Tabelle 3.16 werden die mittels des Limma-Pakets als signifikant identifizierten regulierten Gene nach deren funktionellen Kategorien gezeigt [294]. Die Analyse

Zeitpunkte	Reaktion auf Reize	Antwort auf abiotischen Stress	Antwort auf Hitzestress	Antwort auf Kältestress	hyperosmotischer Salzstress	Antwort auf Lichtstress	Antwort auf äußere Reize	Antwort auf chemischen Stress	Antwort auf osmotischen Stress	Antwort auf Temperaturreize	Antwort auf UV-Stress	Chromosombiogenese	Phenylpropanoidbiosynthese	Photosynthese	Phototropismus	Carotenoidbiosynthese	Chlorophyllmetabolismus	circadianer Rhythmus	Glucosinolatebiosynthese	Sekundärmetabolismen	Vitamin E Biosynthese	Wachsbiosynthese	
3h-1h	28	17	6	9	3	4						7											
6h-3h		7									2		3										
9h-6h	38	21				14								6	4								
24h-9h	181	83				40	31	90	20	30				17		7	8	10	6	43	4	4	
48h-24h	In diesem Abschnitt wurden keine differentiell regulierten Gene gefunden																						
hochregulierte Gene																							
3h-1h	15	8	6	2	2	3						0	0										
6h-3h		4									0	0											
9h-6h	9	4				2								0	0								
24h-9h	76	40				18	20	29	6	16				0		2	1	6	0	4	2	0	
herabregulierte Gene																							
3h-1h	15	10	0	7	1	1						7											
6h-3h		4									2	3											
9h-6h	31	20				14								6	4								
24h-9h	120	49				23	11	61	15	14				17		5	7	4	6	39	4	4	

Tabelle 3.16: Analyse der Genexpressionsprofile mittels LIMMA Paket. Bei der Analyse von zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten können drei Reaktionsstufen erkannt werden. Eine primäre (abiotische-) Hitzestressantwort kommt nach drei Stunden vor. Die zweite Phase beginnt nach sechs Stunden, wobei es sich hierbei um eine allgemeine Stressantwort handelt. Hier wurden unterschiedliche metabolische Prozesse dereguliert. In der dritten Phase zwischen 24h und 48h hat die Pflanze eine Art Gleichgewicht erreicht. Hier wurden keine messbare Veränderungen festgestellt. Gene mit einem p-Value ≥ 0.01 und einer Fold-Induction ≤ 2 wurden verworfen.

konzentriert sich auf die punktuellen Veränderungen zwischen zwei einzelnen Zeitpunkten. Der Vorteil dieser Art der Analyse ist die gleichzeitige Betrachtung zweier benachbarter Zeitpunkte. Die Reaktion auf Hitze wurde in drei sichtbare Phasen unterteilt. Die primäre Antwort in den früheren Zeitpunkten dient vermutlich als Signalgenerierung. Sie wirkt stressspezifisch. In dieser Phase wurden sowohl Chaperone zur Hilfe und zum Schutz exprimiert sowie Proteosome und Abbauproteine für die Beseitigung falsch gefalteter Proteine. Die geringe Anzahl an differentiell regulierten Genen zwischen den Zeitpunkten 3h und 6h deutet darauf hin, dass eine Pause zwischen diesen Zeitpunkten existiert (Tab. 3.16). In dieser Phase wird der metabolische Haushalt der Pflanze auf den Stress umgestellt. In der nächsten Phase beginnt nach 6h die allgemeine Stressantwort etwas verzögert. Bereits hier wurden mehrere metabolische Prozesse reprimiert. In der darauffolgenden Messung wurden dieselben Gruppen mit einer stärkeren Intensität exprimiert. Wie in Tabelle 3.16 zu sehen ist, wurden viele metabolische Prozesse erst nach 24h signifikant dereguliert. Fast alle wurden herabreguliert.

In der Limma-Analyse wurden keine Unterschiede in der Regulation von Genen zwischen den letzten zwei Messungszeitpunkten identifiziert (Tab. 3.16). Dieser Befund deutet darauf hin, dass im pflanzlichen Haushalt eine gewisse Äquilibration erreicht wurde. Die Pflanze befindet sich in einem bestimmten Gleichgewicht zwischen der Transkription neuer Proteine zum Schutz der Pflanze und der Abschaltung metabolischer Prozesse für die Energiesparmaßnahmen. Nach den Ergebnissen beider Analysen kann mit großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass die Pflanze immer noch sehr aktiv auf den Stress reagiert. Eine stetige Erhöhung der Expressionsintensität mehrerer Ubiquitine, Proteosome und Chaperone für den Schutz der Pflanze gegenüber Hitze stellt auch nach 48h eine immer noch wichtige Funktion dar.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der Zeitreihenanalyse darauf hin, dass in der pflanzlichen Stressantwort unterschiedliche Phasen existieren. Die erste Phase findet schnell statt und wirkt

vermutlich stressspezifisch. Hier aktiviert die Pflanze ihre Schutzmechanismen gegen den Stress. Hilfsproteine werden intensiver generiert. Chaperone sowie Ubiquitine, F-Box Proteine und Proteasome werden in diesem Stadium aktiviert. Die kontinuierliche, ungewöhnlich starke Expression der Chaperone in den späteren Zeitpunkten ist hier auffällig. Dies deutet darauf hin, dass die Pflanze trotz des langanhaltenden Stresses versucht, ihre Prozesse zu schützen. In der zweiten Phase wurden viele Mechanismen für die direkte Stressantwort herabreguliert. Obwohl der Energiebedarf wächst, kann die Pflanze wenig neue Ressourcen gewinnen. Sie konzentriert sämtliche Ressourcen auf die Aufrechterhaltung notwendiger Systeme.

Hitzestress verursacht eine starke und schnelle Umstellung des pflanzlichen Haushaltes. Die Stressanalyse in dieser Arbeit hat gezeigt, wie viele Gene tatsächlich vom Stress beeinflusst werden. Ältere Ergebnisse wurden hier bestätigt. Eine Reihe Hitzeschockfaktoren sowie weitere andere Transkriptionsfaktoren wurden (zum Teil spezifisch) unter Hitze stark exprimiert [213, 331]. Es wurden aber auch bisher unbekannte Gene identifiziert, welche explizit unter Hitze dereguliert werden. Die Rolle dieser Gene könnte für das Verständnis der Hitzestressantwort von zentraler Bedeutung sein. Mit Hilfe der Pathway- und Gene-Set-Anreicherungsanalysen wurde hier gezeigt, dass die Pflanze zwei Phasen durchläuft, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. In der ersten Phase wurden Schutzmechanismen hochgefahren. Die Pflanze versucht sich zu schützen. In der zweiten Phase schaltet die Pflanze alle sekundären Metabolismen ab, um Energie zu sparen. So versucht die Pflanze ihre Stresstoleranz zu erhöhen, um die Stressperiode zu überstehen. Ganz neu war die Entdeckung von bestimmten Transkriptionsfaktorbindestellen, welche nur unter Hitzestress signifikant überrepräsentativ vorkommen. Die Antwort hier zeigte eindeutig eine Aufteilung in eine frühe allgemeine und späte stressspezifische Stressantwort.

Um die Mechanismen, die gegen den Stress aktiviert werden und die Pflanze schützen, besser verstehen zu können, sind weitere Experimente nötig. Die Identifikation von Schlüsselgenen, die in diesen Signalwegen mitwirken, kann hierzu einen wichtigen Beitrag leisten. Langzeitstudien könnten dabei helfen, die Umstellung zwischen den Schutz gegen den Stress und Stresstoleranz genauer zu identifizieren.

3.3.2 Stressinduktion durch Trockenheit

Pflanzen werden während ihrer Entwicklungsperiode häufig Trockenstress in verschiedenen Intensitäten ausgesetzt. Aufgrund des trockenheitsinduzierten Stresses werden bestimmte Veränderungen in der pflanzlichen Entwicklung beobachtet. In der phänotypischen Analyse wurden Wachstumsverzögerungen der Rosette und eine verlängerte Wurzel erkannt. Physiologische bzw. molekularbiologische Veränderungen als Reaktion auf den Stress beeinflussen metabolische Prozesse in der Pflanze. Der Stress reguliert die Expression verschiedener Gene (Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen) sowie biochemische und physiologische Vorgänge (Kohlenhydrat- und Energiemetabolismen, Produktion von ROS-Elementen). Es lassen sich zwei Aspekte in der Reaktion der Pflanze auf Trockenheitsstress erkennen. Die Pflanze versucht einerseits ihren Wasserverlust zu reduzieren und die Wasseraufnahme und -speicherkapazität zu erhöhen. Diese Ziele werden insbesondere durch die Schließung der Stomata und ein verstärktes Wurzelwachstum erreicht. Auf der anderen Seite muss die Pflanze versuchen, ihre Zellen gegen den Stress zu schützen. Hierfür wird die Zellwandstruktur modifiziert und verschiedene Substanzen (Salze) werden in der Zelle akkumuliert, um die Reduktion des Wasserpotenzials zu verhindern [328].

Differentiell regulierte Gene unter trockenheitsinduzierten Stressbedingungen Auf molekular-

biologischer Ebene reagiert die Pflanze auf Trockenstress hauptsächlich über zwei regulatorische Wege [223]. Der erste Signalweg wird durch die Synthese und den Abbau des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) reguliert. Die zweite Signalkaskade wird von ABA-unabhängigen Transkriptionsfaktoren kontrolliert (AP2/ERF, NAC, ZF-HD).

Die meisten durch ABA kontrollierten Gene besitzen das ABRE *cis*-Element im proximalen Promotorbereich. Bei dieser Analyse, die im folgenden diskutiert wird, wurden signifikant deregulierte Trockenstressbiomarker identifiziert, die konform mit der Literatur sind [214, 278, 322, 120, 187, 350, 159] (Abb. 3.23). NCED3 hat in der trockenstressabhängigen ABA-Biosynthese eine Schlüsselrolle inne [187]. RAB18 und der Transkriptionsfaktor ATHB-7 wird von ABA kontrolliert. Darüber hinaus wurden in dieser Analyse weitere Faktoren mit einer bisher unbekannt Rolle in der Reaktion auf Trockenstress gefunden. AtbZIP9 (AT5G24800) oder AtbZIP60 (AT1G42990) sind zwei der 15 Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie, die unter Trockenheit dereguliert werden (Tab. 3.17). Wie in Abbildung 3.23 zu sehen ist, verläuft das Expressionsmuster solcher Gene ähnlich zu denen der bekannten trockenstressinduzierten Gene. Neun signifikant deregulierte bZIP-Faktoren (60%) wurden bisher dem Trockenstress noch nicht zugeordnet. Daraus lässt sich postulieren, dass diese Gene eine bestimmte Rolle in der Stressantwort besitzen. Für die Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Experimente notwendig.

LEA-Proteine (Late embryogenesis abundant) wurden in allen Entwicklungsstadien der Pflanze exprimiert. Sie beteiligen sich an mehreren Prozessen zum Schutz der Pflanze gegen abiotische Stressfaktoren [115]. Über die Sequenzähnlichkeitsanalyse wurden in *Arabidopsis* über 50 LEA-Proteine entdeckt. Das LEA-Protein RAB18 weist eine bis zu 115-fach (Zeitpunkt 9h) stärkere Expressionsintensität im Vergleich zur Kontrolle auf, XERO2 (AT3G50970) erreicht eine knapp 100-fache (24h) Intensivierung. Bei weiteren LEA-Proteinen wurden ähnlich starke Expressionsverhältnisse (z.B. AT1G52690 (Abb. 3.23) oder AT5G06760 (Tab. 3.17)) mit einer stetig steigenden Intensität nachgewiesen. Bislang wurden diesen Genen keine biologische Funktionen zugeordnet. Die Rolle von ABA in der Expression der LEA-Proteine während der pflanzlichen Entwicklung [115] und die spätere Expression der Gene in dieser Arbeit deuten auf eine mögliche ABA-Kontrolle dieser Gene hin. Eine Beteiligung im ABA-abhängigen Reaktionsweg auf Trockenstress könnte ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen durch weitere Experimente bestätigt werden.

Dem ABA-unabhängigen Signalweg werden Mitglieder der AP2/ERF- oder NAC-Familien zuge-

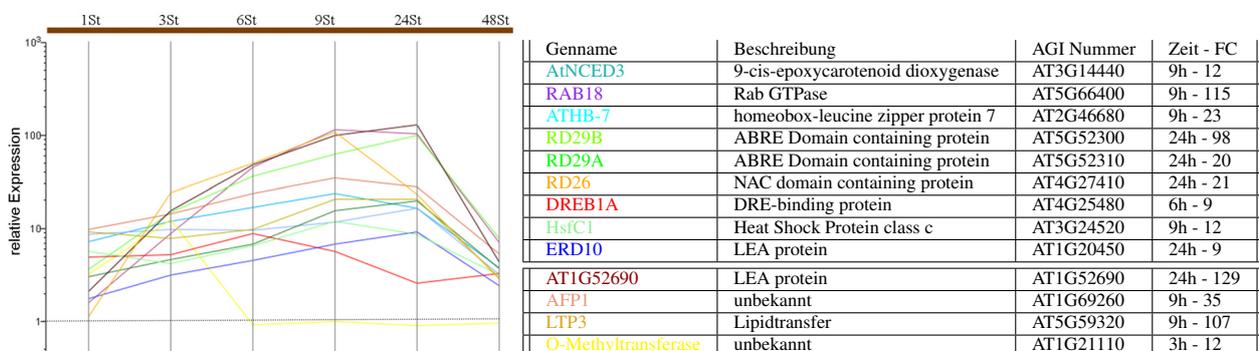


Abbildung 3.23: Deregulierte Markergene unter Trockenheitsstimulus. Das Expressionsverhalten dieser Biomarker spiegelt das allgemeine Profil der hochregulierten Gene unter Trockenstress wieder. Bei diesem transienten Expressionsverlauf steigt die Intensität kontinuierlich bis 24h. Anschließend reduziert sich die Expression auf das Anfangsniveau. Das Histogramm zeigt die relativen Expressionswerte der angezeigten Gene im Vergleich zur Kontrolle (die gestrichelte Linie bei 1 deutet auf relative Expression= 0 hin). Die Tabelle gibt für spezifische Trockenstress-Biomarker die maximale Expressionsintensität an den genannten Zeitpunkten wieder. Die letzten vier Gene in der Tabelle weisen ebenfalls eine spezifische Reaktion auf den Stress auf. Die Rolle dieser wie auch weitere in dieser Analyse identifizierten Gene im Trockenstress ist noch nicht bekannt.

Genname	AGI Nummer	Bezeichnung	Foldinduktion (Zeit)
Reaktion auf Stress			
RAB18	AT5G66400	Rab GTPase 18	115 (9h)
XERO2	AT3G50970	Low Temperature induced 30	97.7 (24h)
RD26	AT2G33380	Responsive to desiccation 26	20.7 (24h)
PP2C	AT5G59220	Phosphatase	36.8 (9h)
DREB1A	AT4G25480	DRE binding element 1A	8.8 (6h)
GBF3	AT2G46270	G-box binding factor 3	11 (9h)
RD29A	AT5G52310	Cold regulated 78	19.6 (24h)
ERD10	AT1G20450	Early rsponsive to dehydration 10	9.2 (24h)
Lipidtransport			
COR12	AT4G33550	LEA-like protein	78.9 (24h)
AT2G37870	AT2G37870	Protease inhibitor	59.9 (24h)
LTP3	AT5G59320	Lipid transfer protein 3	107.5 (9h)
LTP4	AT5G59310	Lipidtransferprotein 4	28.1 (9h)
Entwicklungsprozesse			
VSP2	AT5G24770:AT5G24780	vegetative storage protein 2	8.9 (24h)
Nodulin	AT5G13170	nodulin	15.2 (24h)
AT5G06760	AT5G06760	Lea Protein	70.7 (24h)
DNA-Prozesse			
HIS1-3	AT2G18050	Histone H1-3	28.7 (24h)
ATHB-7	AT2G46680	ATH Homeobox 7	23.7 (9h)
ATHB-12	AT3G61890	homeobox-leucine zipper protein 12	22 (9h)
Zellwandmodifikation			
Pectinase	AT1G48100	pectinase family protein	8.5 (3h)
CSLA10	AT1G24070	Cellulose synthase-like A10	10.1 (9h)
carboxylesterase	AT1G57590	carboxylesterase	18.6 (24h)
Hormonmetabolismus			
AFP1	AT1G69260	ABI Five binding protein	34.6 (6h)
ABF3	AT4G34000	ABA-responsive elements-binding factor	10.7 (6h)
ABI1	AT4G26080	protein phosphatase 2C	5.4(9h)
KIN2	AT5G15960:AT5G15970	Cold responsive 6.6	10.2 (24h)
CYP707A2	AT2G29090	cytochrome P450 family protein	3 (48h)
CYP707A4	AT3G19270	cytochrome P450 family protein	4 (24h)
Transportproteine			
AT2G41190	AT2G41190	amino acid transporter family protein	22.4 (9h)
AT2G16990	AT2G16990	unknown	8.3 (24h)
Kohlenhydratmetabolismus			
TPS5	AT4G17770	trehalose phosphatase/synthase 5	2.7 (9h)
IPS2	AT2G22240	inositol-3-phosphate synthase 2	3.8 (24h)
SIP1	AT5G40390	seed imbibition1-like	2.5 (9h)
Aminosäuremetabolismus			
P5CS	AT2G39800:AT3G55610	Pyrroline-5-carboxylate synthase 2	11.9 (9h)
Proteinmodifizierung			
XERICO	AT2G04240	Ring-H2 zinc-finger motif	4 (9h)
MYB43	AT5G16600 6	Myb domain protein 43	4.4 (24h)
Energiemetabolismus			
LHCB4.3	AT2G40100	light harvesting complex PS-II	1/2.2 (48h)
NIR1	AT2G15620	Nitrit reductase	1/2.4 (3h)
Plastocyanin	AT5G15350	unbekannt	1/5.1 (6h)

Tabelle 3.17: Das Expressionsverhalten deregulierter Gene unter trockenheitsinduziertem Stress. Aufgelistet wurden deregulierte Gene mit einer mindestens zweifachen Expressionsintensität (im Vergleich zur Kontrolle) aus verschiedenen überrepräsentativen metabolischen Prozessen und biologischen Funktionen unter Trockenheit. Die Fold-Induktion in der rechten Spalte gibt den höchsten Wert (und Zeitpunkt) im Experimentverlauf wieder. Einige Gene wie z.B. MYB43 oder AT5G06760 wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal mit der Trockenstressantwort der Pflanze in Zusammenhang gebracht.

ordnet (Abb. 3.23 und Tab. 3.17). Transkriptionsfaktoren (wie z.B. RD26, DREB1A oder ERD10) und deren kontrollierte Gene wurden unter Trockenheit dereguliert. DREB1A besitzt ein DRE-Element im Promotorbereich und wurde bereits nach einer Stunde 5-fach stärker exprimiert mit einem Maximum bei 6h. Zwölf weitere AP2-Proteine zeigten in dieser Analyse eine differentiell regulierte Expression (Abb. 3.24.B, links). Drei herab- und fünf hochregulierte Gene konnten noch nicht mit Trockenstress in Verbindung gebracht werden.

DREB1A kontrolliert die Expression mehrerer Gene wie z.B. RD29A, KIN2, ERD10, GOLS3 oder P5CS (Prolinbiosynthese), die bei Trockenheitsbedingungen hochreguliert wurden (Tab. 3.17) [159, 143, 120]. Sie erreichten ein Maximum in den späteren Zeitpunkten (Abb. 3.24.B). NAC-Proteine nehmen an den Entwicklungsprozessen verschiedener Organe teil (Meristem, laterales Wurzelsystem oder Blüten). ANAC19 und RD26 (ANAC072) wurden bereits eine Stunde nach Stressbeginn 10-fach bzw. 50-fach hochreguliert (Tab. 3.17 und Abb. 3.24.C, [186, 236]). Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit einer regulatorischen Aufgabe unter Trockenstress ist die der RING-

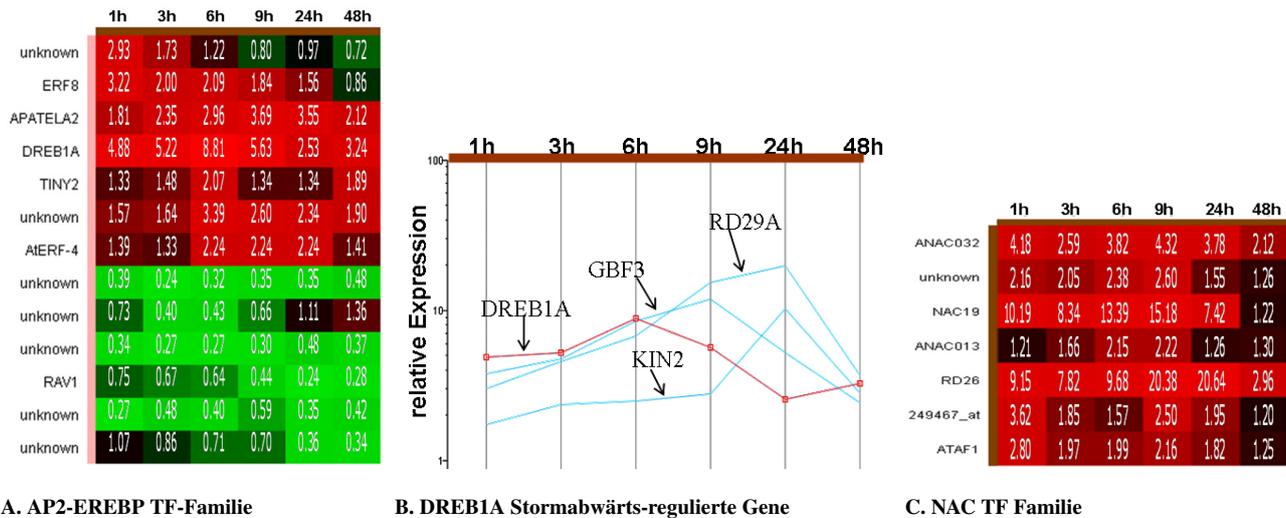
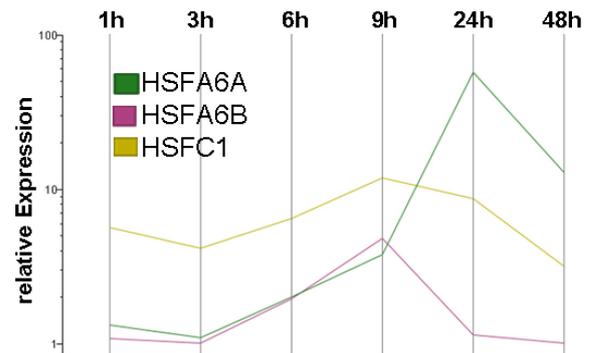


Abbildung 3.24: Bekannte so wie neue Transkriptionsfaktoren unter dem Trockenstresseinfluss. AP2- (A) und NAC-TF(C) wurden unter Trockenstress signifikant dereguliert. Alle NAC-Gene wurden hochreguliert, AP2-TFs zeigten ein unterschiedliches Verhalten. DREB1A (rot, B) kontrolliert die Expression verschiedener unter Trockenstress deregulierter Gene wie z.B. RD29A oder KIN2. DREB1A-Expression erreicht ein Maximum nach 6h. Die Expression der stromabwärts-regulierten Gene erreicht das Maximum zu einem späteren Zeitpunkt (Tab. 3.17).

H2 Zinkfingerproteine wie z.B. das XERICO Gen (Abb. 3.23) [156, 173]. Zinkbindemotive variieren in deren Struktur und entsprechend in ihrer Funktion. Sie regulieren RNA-, DNA- und Proteininteraktionen. Sie repräsentieren einen wichtigen Teil verschiedener Signalübertragungswege und spielen eine Rolle bei der Reaktion der Pflanze auf verschiedene Stressfaktoren. In Abbildung 3.26 (Seite 75) wurden die regulatorische Rolle von ABA und die von ihr kontrollierten metabolischen Prozessen dargestellt. Mehrere Prozesse der DNA-Modifizierung sowie Entwicklungsprozesse (Wachstum, Zellteilung usw.) wurden durch die erhöhte Produktion des Phytohormons kontrolliert. Positive Regulatoren der ABA-Biosynthese (z.B. OST1, NCED3, AAO3, ABA2 [359, 277, 211, 99, 221]) weisen eine kontinuierlich hohe Expression auf (Abb. 3.26). Dagegen zeigen viele negative Regulatoren keine differentiell regulierte Expression (z.B. DOR, PLD, ABH1, ERA1 [126, 58, 359]). Die zelluläre ABA-Homeostase wird u.a. durch XERICO und AtTLP9 (At3g06380) reguliert [156]. Während XERICO, wie in Abbildung 3.26 abzulesen ist, in dieser Arbeit hochreguliert wurde, weist AtTLP9 keine Veränderungen auf. Das lässt vermuten, dass diese Regulatoren bei unterschiedlichen Prozessen aktiviert werden bzw. für verschiedene Rollen im pflanzlichen Metabolismus zuständig sind. Die zelluläre ABA-Konzentration erhöht sich. Das ist die Erklärung für die spätere Erhöhung der Expressionsintensität verschiedener CytP450 Gene (Tab. 3.17), die für den ABA-Abbau zuständig sind. Die Gleichgewichtsverhältnisse zwischen der Biosynthese und dem Katabolismus werden durch die Expression verschiedener Ubiquitine und Proteasen aufrechterhalten. Die Hydroxylation der 8'-Position des ABA-Moleküls ist bekannt als der wichtigste Schritt beim ABA-Katabolismus [264]. Die CYP707As, welche diesen Prozess durchführen, wurden in späteren Zeitpunkten (9h-48h) hochreguliert (Tab. 3.17).

Sowohl in der Gruppe der ABA-abhängigen Gene als auch in der ABA-unabhängigen Gengruppe wurden weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert. Mehrere durch XERCIO regulierte Gene wurden unter Trockenstress differentiell reguliert. MYB43 bzw. bHLH101 wurden zum Beispiel unter lang anhaltendem Stress kontinuierlich stärker exprimiert. Desweiteren befinden sich Gene mit einer Funktion in verschiedenen metabolischen Prozessen (Hormon-, Lipid- oder Sekundärmetabolismus), in der RNA- bzw. DNA-Regulation (Proteinabbau, Transkriptionsregulation) oder in den strukturellen

Abbildung 3.25: Expressionsverhalten der Hitzeschockfaktoren unter Trockenstress. Im Gegensatz zum gewohnten sehr frühen Expressionsverhalten unter Hitze werden diese Hsfs unter Trockenheit relativ spät exprimiert. HSFA6a weist eine sehr starke, trockenstressspezifische Expression auf.



Zellwandmodifikationen (Tab. 3.17). Die Gruppe der NF-Y Transkriptionsfaktoren bildet heterotrimerische Strukturen (NF-YA, -B und -C). Manche dieser nuklearen Faktoren (NFYA5 und NFYA7, aber auch bisher unbekannte HAP3 und HAP5 (NF-YB und -YC)) wurden unter Trockenheitsbedingungen differentiell reguliert. Verschiedene MYB- bzw. MYC- oder bHLH-Gene wurden in dieser Analyse unter Trockenstress dereguliert. Nur wenige dieser Gene weisen bereits eine annotierte Funktion auf. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es gelungen, weitere nicht-annotierte Gene der Trockenstressreaktion zugeordnet werden. Wie in Abbildung 3.25 sichtbar ist, wurden in der Analyse der pflanzlichen Reaktion auf Trockenstress drei Hitzeschockfaktoren differentiell reguliert. Im Gegensatz zu früheren Experimenten [208] weisen HSFA6a und -6b eine spezifische Stressreaktion unter Trockenheitsbedingungen auf. Das HSFC1-Gen zeigt dagegen in dieser Arbeit eine intensive Expression in allen drei osmotischen Stressfaktoren (Salz-, Kälte- und Trockenstress). Obwohl die Funktion dieser Gene unter Trockenheit noch nicht identifiziert wurde, lässt deren erhöhte Aktivität in den späteren Zeitpunkten (Abb. 3.25) auf eine korrelative Regulation mit weiteren Chaperonen und Schutzproteinen (LEA, Osmolyten) in der Reaktion auf Trockenstress vermuten.

Gensignaturanalyse der deregulierten Gene unter Trockenstress zur Bestimmung der biologischen Funktion Die Analyse der Gensignaturen auf die Trockenstressreaktion ergab unterschiedliche spezifische Funktionen, welche in Tabelle 3.18 dargestellt wurden. Abscisinsäure (ABA) übt einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der pflanzlichen Reaktion auf Trockenstress aus. ABA spielt eine wichtige Rolle in mehreren metabolischen Prozessen. In dieser Analyse wurden u.a. Veränderungen im Kohlenhydratmetabolismus, bei der RNA-Prozessierung (Ribosombiogenese, Nukleosidmetabolismus usw.), in den Entwicklungsprozessen (Wachstum, Reifung, Zellteilung usw.), im Phenylpropanoidmetabolismus sowie im Aminosäuremetabolismus [146, 111, 174] identifiziert. ABA übt ebenfalls Einfluss auf den Prozess der Samenreifung aus. Verschiedene Schlüsselgene im Lipidmetabolismus stehen unter ABA-Kontrolle [268, 94]. In dieser Analyse wurde für die Prozesse Lipidmetabolismus bzw. -transport in den frühen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle identifiziert. Daraus lässt sich schließen, dass ABA auch unter Trockenheit eine Rolle in der Regulation von Lipiden ausübt.

Wie in Tabelle 3.18 zu sehen ist, werden Phosphatasen unter trockenheitsinduziertem Stress differentiell reguliert. Proteinphosphatasen sind Signalmoleküle, die an mehreren metabolischen Prozessen, wie dem Schutz gegen abiotischen Stress teilnehmen (z.B. ABI1, ABI2 in Abb. 3.26). Zusammen mit spezifischen Kinasen funktionieren sie als An/Aus-Schalter für die ABA-Signalweiterleitung. Von Stressbeginn an wurden Proteinphosphatasen der Klassen 2C und 2D intensiver exprimiert. Außer den bekannten PP2C, ABI1 und ABI2 wurden auch AHG3, HAB1 und HAB2 kontinuierlich exprimiert. Diese Proteine dienen als negative Regulatoren des ABA-Signalweges [227, 306]. Darüber hinaus

GO-Level	Biologische Funktion	Gengruppen	1h	3h	6h	9h	24h	48h	Quelle	
Hormonreaktion	Reaktion auf ABA	hochreguliert	+	+	+	+	+	+	[146],2	
		herabreguliert	+	+	+	+	+	+	[146],2	
		EMBPITEAM	+		+	+			3,9	
		ABA Signaltransduktion	+	+	+	+	+	+	[197],2,3	
		ABA-induzierter Hormonmetabolismus				+	+	+	[239, 197],2,3,4	
	Auxin		+		+	+		[44],4		
Translation & Transkription	Nukleotidmetabolismus	DNA-Synthese		+	+	+	+		5,6	
	Nucleosidmetabolismus	Phosphoribosyltransferase				+			2,5	
	Ribonucleoproteinbiogenese	Helikasen (DEAD)		+	+	+	+		2,5,6	
	Ribosomstruktur & Biogenese	kleine & große Untereinheiten.		+	+	+	+		2,5,6	
	Zellkernkomponente	Ribonucleoproteinkomplex Synthese		+	+	+			2	
	Translation	HGTP BD (all)		+	+		+		2	
	metabolische Prozesse	rRNA, Ligase		+	+	+	+	+		2
		tRNA-aminoacylation			+	+	+	+		2
	Zytosolkomponente			+	+	+	+	+	2,4	
	Stabilisierung und Bindung	Pentatricopeptide, TPR		+	+	+	+		3,4	
Signalwege	Proteinbindedomäne - LRR	disease resistance	+					+	4	
	ATP-Bindungen - NB-arc, TIR	disease resistance	+						2,4	
	Proteinphosphatase	ABIP		+	+	+	+	+	2,4	
	DNA-Bindungen	G-box Faktoren, GBOXLERBCS Bindestelle	+			+			2,9	
Entwicklung	LEA Proteine	Schutz gegen abiotischen Stress		+	+	+	+	+	[60],2,3,5	
Zelluläre Strukturen	Zellwand	membraneverankerte Proteine, Cellulose, Pektin	+	+	+	+	+	+	2,3	
		Zelladhäsion, Fasciclin	+		+	+	+	+	2	
	Cytoskelett	Tubulin				+	+		2,4	
	Nukleotide	mitochondrische DNA Kompartimente				+			2	
	Plastide	Chromosome				+			2	
	Chloroplast	Thylakoide			+	+	+	+	2	
	Photosystem		+	+					2	
Energie-metabolismus	Photosynthese	Lichtreaktion	+	+					2,6	
	Chlorophyllbiosynthese		+	+					2	
	Methanmetabolismus					+			2,5,8	
Sekundär-methabolismen	UDP-glycosyltransferase	Anthocyanin Pigmentbiosynthese	+		+				2,4	
	Phenylpropanoidbiosynthese	Flavonoide, Lignin		+	+	+	+	+	[35, 138],2,6	
	Carotenoidbiosynthese			+					5	
	Flavonoide		+						3,5,6	
Aminosäure-metabolismus	Phenylpropanoidbiosynthese	Flavonoide, Lignin		+	+	+	+	+	[35, 138],2,6	
	Aminosäure-Aktivierung	Aln, Asp, tRNA-Synthetase		+	+	+	+		2,5	
	Biosynthese	Riboflavin							2	
Lipid-metabolismus	Polyketide, Fettsäuren				+				2,5	
	Phospholipide			+	+				2	
Kohlenhydrat-metabolismus	Glycoproteine (AGP)	Zellwand	+	+	+			+	3	
	Glucanmetabolismus		+		+	+	+		2	
	Kohlenhydrate	Hydrolyse	+	+	+	+	+	+	2,4	
	Sucrose	Biosynthese, Metabolismus	+	+		+	+	+	1,3,4,5,8	
	Stärkemetabolismus		+			+	+	+	2	
	Jacalin							+	4	
	Galactosidase	Hydrolyse, Glycosyl		+	+	+			2	

Tabelle 3.18: Anreicherung biologischer Funktionen unter Trockenheitsbedingtem Stress. Unter Trockenstress wurden unterschiedliche metabolische bzw. physiologische Prozesse dereguliert. Die dargestellten Gensignaturen wurden aufgrund ihrer Anreicherung unter allen Zeitpunkten in dieser Analyse ausgewählt. Die pflanzliche Trockenstressantwort ist mit der ABA-Regulation (Abb. 3.26) stark verknüpft. Die Prozesse der DNA-Synthese und Translation wurden bei Trockenheit reprimiert, sowie die Gene der strukturellen Zellintegrität herabreguliert. Die Aktivität verschiedener Polysaccharide wie Stärke oder Sukrose weisen ebenfalls eine erhöhte Aktivität unter Trockenstress auf. 1- Referenzen; 2- GO Annotationen; 3- Mapman; 4-Pfam; 5-KEGG; 6- AraCyc; 7-DATF; 8- Kinasen; 9- Bindestellenanalyse

sind weitere Proteinphosphatasen der SnRK-Familie (z.B. OST1, SnRK1, -2), die in dieser Arbeit hochreguliert wurden, für ihre Rolle im ABA-Signalweg bekannt. Eine Gruppe von ABA-Rezeptoren (PYR/RCAR/ABIP) ist für das Einfangen der PP2C-Gene verantwortlich [267]. Diese Rezeptoren besitzen eine handförmige Struktur, in der die ABA-Moleküle hineinpassen. Die PP2C-Moleküle binden dann an diese Rezeptoren und stehen dadurch für die negative Regulation der Stressreaktion nicht mehr zur Verfügung. Diese Erkenntnisse können die kontinuierliche Stressreaktion durch ABA-abhängige Gene erklären. Um die Komplexität der Proteinphosphatasenrolle in der Stressantwort zu verdeutlichen, soll darauf hingewiesen werden, dass manche Phosphatasen unter Trockenstress hochreguliert wurden (u.a. AT1G66090 [20-fach], AT3G08590 [5-fach], AT5G59220 [4-fach]). Ein möglicher Grund dafür ist z.B. die Bindung der ABIP-Genprodukte an PP2C. Sie blockieren die PP2-Gene und reprimieren sie. Es scheint ein gewisses Gleichgewicht zwischen der Aktivierung und der Inhibition des ABA-abhängigen Signalweges durch die Proteinphosphatasen zu existieren.

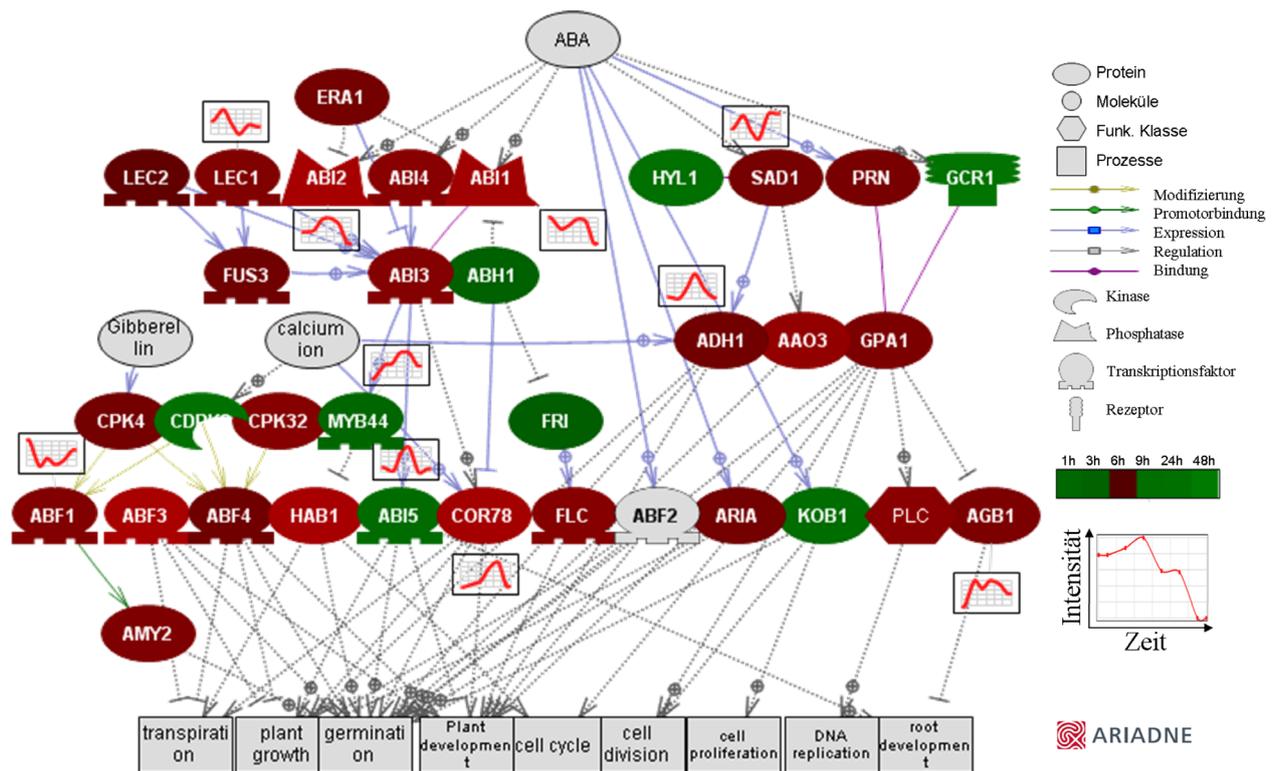


Abbildung 3.26: Die Regulation von ABA-kontrollierten Prozessen unter trockenheitsbedingtem Stress. Das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) kontrolliert mehrere Zellzyklus- und Entwicklungsprozesse. Trockenheit führt zu Veränderungen in der Genexpression vieler ABA-regulierten Gene. Durch die Akkumulation der zellulären ABA wurden verschiedene metabolische Prozesse und strukturelle Komponente differentiell reguliert. Die Schließung der Stomata wird durch Trockenstress induziert (Transpiration). Wurzel- und Sprosswachstum werden durch den Stress beeinflusst. Bei einem lang anhaltendem Stress werden CytP450 Gene, die den ABA-Abbau regulieren, stärker exprimiert. Das Netzwerk wurde mit Hilfe der 'Pathway Studio Software Paket' V. 6.2 erstellt [226, 11].

Das niedrige Wasserpotenzial in den Blättern und die Ausschüttung des ABA-Hormons leiten die Schließung der Stomata als Reaktion auf den Trockenstress ein (Tab. 3.18, Abb. 3.26). Wie auf Seite 75 abgebildet ist, zeigt die Analyse eine kurzfristige, erhöhte Aktivität der lichtabhängigen Photosynthese (PS-II) sowie ihrer Strukturelemente (Abb. 3.27). Dies deutet auf eine zwei Phasen-Antwort der Pflanze auf den Stress hin. In der ersten Phase arbeitet das Photosystem II weiter und versucht die Akkumulation der durch den Stress entstehenden ROS-Elemente zu verhindern. In der zweiten Phase wurden karboxylierende Enzyme (z.B. Rubisco) und die Elektronentransportgene herabreguliert. Dies führt im weiteren Verlauf zum Zusammenbruch des kompletten Systems. In dieser Phase kann die Photosynthese nicht mehr korrekt arbeiten [354].

Einen wichtigen Bestandteil des pflanzlichen Schutzes gegen Wassermangel stellt die Gruppe der osmotischen Schutzmittel (Osmoprotectants) dar [171]. Trehalose wirkt bereits in kleineren Konzentrationen als ein sehr effizienter Osmolyt [66]. Da dieses Molekül in Pflanzen eher rar ist, wird Sucrose als Ersatz für den Schutz gegen die veränderten Konzentrationsverhältnisse in der Zelle verwendet. Wie in Abbildung 3.28 dargestellt wird, kann eine Erhöhung des zellulären Kohlenhydratmetabolismus beobachtet werden. Galactinol-, Raffinose- und Sucrosesynthasen wurden in dieser Analyse intensiver exprimiert [46, 82, 269]. Während bei der Trehalose und Sucrose die Gene für die Erstellung der Moleküle überwiegen (Tab. 3.19), wurden beim Stärkemetabolismus eher die Gene für den Katabolismus intensiver exprimiert (Abb. 3.28). Die Nitratreductase (NR1) spielt eine wichtige Rolle bei der Stickstofffixierung und dessen Konvertierung zu Aminosäuren. Wasserstress führt zum Abbau

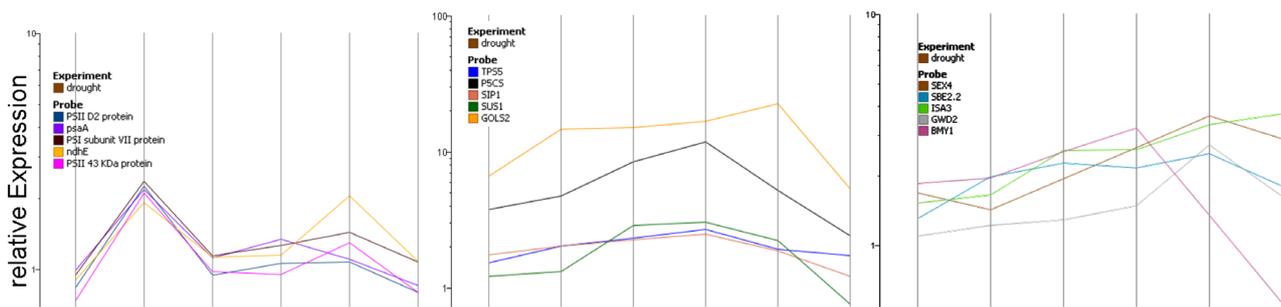


Abbildung 3.27: Gene des Photosystems II unter Trockenstress. Die frühe Expression der PS-II Gene deutet auf den Versuch hin, die Akkumulation der ROS-Elemente zu vermindern.

Abbildung 3.28: Osmotischer Schutz gegen Trockenheit. Osmolyten weisen eine relativ schwache, wenn auch konstant signifikante Expression im Verlauf des Stresses auf.

Abbildung 3.29: Expression der Gene zur Stärkeabbau. Stärke als Energiespeicher wird in den späteren Phase abgebaut, um den Energiemangel auszugleichen

dieses Enzyms und dadurch zu einer Störung im Assimilierungsprozess (Tab. 3.19).

Eine weitere wichtige Reaktion auf Trockenstress ist die Reduktion der Translationsmaschinerie. His1-3 gehört zur Gruppe der bekannten Linkerhistonen (H1-1 bis -3). Bereits bewiesen ist deren Expression unter trockenstressbedingter Antwort im Wurzelmeristem. Dort inhibieren sie verschiedene Translationsprozesse [14]. Wie aus Tabelle 3.19 sichtbar ist, wurde His1-3 in dieser Analyse ebenfalls mit steigender Intensität kontinuierlich hoch exprimiert. Die Expressionsänderung dieser Gene in den gestressten Pflanzen wurde unter Trockenstress in den Sprossen bestätigt, was auf einen Transfer der Stresssignale von der Wurzel hindeutet. Eine wahrscheinliche Rolle dieser Linkerhistone ist die Repression verschiedener Translationsprozesse in den Blättern bzw. im Spross [15]. DNA- und RNA-Helikasen sind essentielle Bestandteile der Transkription bzw. der Translation. Die Expressionsherabsetzung der Linkerhistone führt zur Verlangsamung der entsprechenden Prozesse. Die RNA-Helikasen nehmen am Spleißen und an der Ribosomenbiogenese teil. Wie die Resultate dieser Arbeit zeigen, wurden DEAD-box, DNA-, ATP-abhängige bzw. ATP-unabhängige Helikasen (zum Teil mit einer bisher nicht identifizierten Funktion) aufgrund des Stresses herabreguliert (Tab. 3.19). Ein weiterer Faktor bei der Translationskontrolle sind die Ribosomen. In früheren Analysen mit unterschiedlichen Pflanzen (z.B. *Glycine max (L.) Merr.* [150], *Nicotiana tabacum* [145]) wurde bereits von der Inhibierung der Ribosome als Reaktion auf Dehydrierung berichtet. Hier wurde herausgefunden, dass ähnliche Mechanismen bei *Arabidopsis thaliana* die Translationsprozesse herabregulieren (Tab. 3.18). Dabei handelt es sich um verschiedene Gene der RPL-, RFC- und RPS-Proteinfamilien, deren Funktion die Aufrechterhaltung der Stabilisierung der Ribosome für die RNA-Bindungen (Translationsinitiation bzw. -elongation) bzw. Gene ist (Tab. 3.18). Wie aus Abb. 3.26 erkennbar ist, führt der trockenheitsinduzierte Stress zu der Akkumulation von ABA-induzierten Genen. Dadurch wird die DNA-Replikation intensiver exprimiert.

Eine weitere Gruppe der herabregulierten Gensignaturen beinhaltet Gene bzw. Genprodukte der strukturellen Integrität der Zellwand und der Zelle. Fascicline regulieren Prozesse der Zelladhäsion. Arabinogalactane dienen als strukturelle Moleküle in der Zellwand. Pektine verleihen der Zelle ihre Festigkeit, kontrollieren verschiedene Wachstumsprozesse und werden vom Wasserhaushalt reguliert. Die Aktivität dieser Genprodukte wurde in dieser Arbeit herabreguliert (Tab. 3.19). Dadurch reduzierte sich das zelluläre Wasserpotenzial als Folge des Trockenstresses. Infolgedessen wurde die Zellstruktur beschädigt. Das führt zu einem Wasserverlust in der Zelle, so dass der osmotische Stress wächst. LRR-Proteine (Leucine-rich repeats) sind an mehreren Funktionen in der Pflanze beteiligt. Nur wenige dieser Gene sind bis heute komplett annotiert. Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnten einige LRR-Gene identifiziert werden, die unter Trockenstress eine signifikante dif-

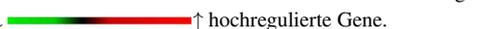
ferentiell regulierte Expression gezeigt haben. Wie in Tabelle 3.19 ersichtlich ist, wurden mehrere Gene aufgrund des Trockenstresses herabreguliert. Signifikant sind dabei insbesondere AT4G13340 (3,6-fach [6h]) oder AT3G04210 (5,3-fach [48h]). Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Rolle der LRR-Gene in der Regulation der strukturellen Integrität der Zelle als Antwort auf einen trockenheitsbedingten Stress hin.

Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen in trockenstressinduzierten Genen Die Resultate der Transkriptionsfaktorbindestellenanalyse (TFBS) zeigen keine spezifischen Bindestellen für den Trockenstress. Ein wahrscheinlicher Grund ist die geringe Anzahl an Genen, welche unter Trockenheit signifikant dereguliert wurden. Ein weiterer Grund könnte in der intensiven Kontrolle des Trockenstresses durch ABA liegen. ABA ist ein allgemeines Stresshormon, das nicht nur unter Trockenheitsbedingungen eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei weiteren osmotischen Stressfaktoren, wie Kälte oder Salz. Die Tatsache, dass trotz dieser schwachen Antwort auf den Trockenstress die Motive für die allgemeine Stressantwort auch unter Trockenstress gefunden wurden, deutet darauf hin, dass diese Motive beim Trockenstress tatsächlich eine wichtige Rolle spielen könnten.

Die Resultate der Analyse für die Transkriptionsfaktorbindestellen, die in Tabelle 3.20 abgebildet wurden, bestätigen die ABA-Kontrolle über mehrere Prozesse unter Trockenstressbedingungen [73]. Acht von neun Promotormotive, die unter Trockenstress überrepräsentativ identifiziert wurden, gehören entweder direkt zur Gruppe der ABA-abhängigen Gene oder werden durch ABA dereguliert. Sieben Motive wurden hier mit der allgemeinen Stressreaktion in Verbindung gebracht, da sie mehrere Treffer in allen Stressfaktoren aufweisen. Die restlichen drei Motive wurden als spezifische Antwort auf osmotische Stressfaktoren identifiziert. Osmotischer Stress wird als die Veränderung der Konzentration löslicher Stoffe innerhalb der Zelle bzw. in deren Umgebung definiert, was einen Wassertransport über die Zellmembran zur Folge hat. Trockenheit (PEG), Salzstress und Kälte rufen osmotischen Stress hervor.

Sechs der sieben Motive der allgemeinen Stressantwort, die in Tabelle 3.20 aufgelistet sind, weisen eine ABRE-Bindestelle auf. Das siebente Motiv, ACGTABOX, ist eine Bindestelle für AP2/EREBP-Proteine. Von 71 identifizierten Transkriptionsfaktoren gehören viele der Familie mit einer ABA-abhängigen Rolle an. Die bZIP-Proteine (ABF3, BZIP1) binden an ABRE-Motive unter ABA-Einfluss. MYC- und MYB-TF wurden ebenfalls aktiv ist, sowie Faktoren aus der Familie der Homeobox-Domäne (ATHB7, -12). Diese dienen als negative Regulatoren des ABA-Hormons. ABA-unabhängige

Stoffwechselweg	Gene	Zeitpunkt						Literatur
		1.54	2.03	2.32	2.67	1.92	1.72	
Trehalose-biosynthese	TPS5	1.54	2.03	2.32	2.67	1.92	1.72	Garg, A. [82]
	AT4G22590	1.02	1.66	2.49	3.74	1.34	1.22	Sazzad, K. [269]
Nitrat-assimilation	NIR1	0.72	0.41	0.44	0.53	0.54	0.54	Silveira, J.A.G [59]
	NR1	0.74	0.42	0.30	0.32	0.38	0.38	Schmadel-Hageböiling, H.E. [272]
Chromatinstruktur	HIS1-3	2.69	4.76	6.64	9.21	28.73	7.78	Ascenzi, R. [16]
Helikasen	STRS1	0.84	0.41	0.44	0.65	0.84	1.14	Kant, P. [141]
	DEAD Box Helikase AT3G18600	0.89	0.36	0.37	0.43	0.47	1.16	
	DEAD Box Helikase AT1G59990	0.92	0.55	0.46	0.49	0.69	0.95	
Zellstruktur	LRR Protein AT4G13340	0.20	0.50	0.28	0.30	0.26	0.38	
	RLK Kinase AT1G52290	0.41	0.36	0.33	0.39	0.42	0.45	
	FLA9	0.21	0.13	0.06	0.11	0.08	0.15	
	AGP7	0.27	0.56	0.30	0.39	0.43	0.48	

Tabelle 3.19: Expressionsveränderung verschiedener Signalübertragungswege unter Wasserstressbedingungen. Als Reaktion auf Trockenstress wurden unterschiedliche metabolische Prozesse verändert. Bei den Kohlenhydraten wurden die langkettigen Stärkemoleküle zu den Grundbausteinen, Sucrosen, abgebaut, um die Pflanze mit der nötigen Energie zu versorgen. Aufgrund fehlender Ressourcen (niedriger Nitratflux, Schließung der Stomata, umgekehrtes Wasserpotenzial) wurden verschiedene Energiemetabolismen, wie hier die Assimilation von Nitratmolekülen herabreguliert. Die Farbmarkierung entspricht die folgende Expressionsintensitäten: Herabreg. Gene ↓  ↑ hochregulierte Gene.

Transkriptionsfaktoren nehmen ebenfalls an der Regulation des Trockenstresses teil. Hier findet man bestimmte AP2/EREBP (DRE-Elemente) oder NAC-Proteine. Hinzu kommen weitere TF z.B. aus den Familien TCP, Trihelix oder C2C2-GATA. Wie diese Faktoren kontrolliert bzw. reguliert werden ist zwar noch nicht bekannt, sie wurden aber einer Funktion in der Entwicklung und Differenzierung bzw. Chromatinregulation zugewiesen, also Prozessen, die indirekt von ABA kontrolliert werden.

Aus der Analyse erkennt man, dass ABA nicht nur die Reaktion auf Trockenstress reguliert, sondern auch bei der Stressregulation anderer Stressfaktoren wie Kälte, Salz oder des chemischen Stresses eine wichtige Rolle besitzt. In Tabelle 3.21 wurde die Anreicherung der in der TFBS-Analyse identifizierten Motive in unterschiedliche funktionelle Kategorien unterteilt. Die Mehrheit dieser Motive zeigt eine Anreicherung nicht nur in der Reaktion auf Trockenheit, sondern auch auf Kältestress, Salzstress sowie den chemischen und hormonellen Stress. Bei diesen Reaktionen wurden deregulierte Gene mit sowohl ABRE- als auch DRE-Promotormotiven identifiziert. Ein möglicher gemeinsamer Signalweg der Stressantwort bei verschiedenen Stressfaktoren wurde hiermit bestätigt. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen die Komplexität der Stressantwort sowie einen Zusammenhang in der pflanzlichen Reaktion auf verschiedene abiotische Stressfaktoren. Gene, die in dieser Arbeit gefunden wurden, werden durch mehrere abiotische Faktoren reguliert. Manche Gene sind bereits bekannt (ob durch ABA kontrolliert oder unabhängig davon). Es wurden hier weitere, bisher noch nicht identifizierte Transkriptionsfaktoren bestimmt, die zum Teil sogar eine trockenstressspezifische Reaktion aufweisen. Für eine genauere Bestimmung der Funktion dieser Gene sind weiterführende Experimente nötig.

Das Motiv ABREATCONSENSUS ([CT]ACGTGGC, [140]) wurde bereits bei ABA-kontrollierten Genen identifiziert. Das Motiv ist eine Bindestelle für die ABF-Transkriptionsfaktorfamilie. ABF-Gene (ABA responsive elements binding factor) sind bekannt für ihre durch ABA-kontrollierte Expression und die Regulation der Stressantwort durch verschiedene Signalwege. In der Analyse der TFBS wurde eine Akkumulation solcher Gene in der funktionellen Kategorie der Trehalosebiosynthese identifiziert (Tab. 3.21). Aufgrund der Tatsache, dass die Analyse für dieses Motiv keine ABA-relevanten Treffer liefert, wurde hier postuliert, dass die Trehalosebiosynthese einen ABA-unabhängigen Weg durchläuft. Es wurden bestimmte Trehalose-6-Phosphatasen mit diesem Motiv im Promotorbereich identifiziert (AT5G65140, AT2G22190) [301], die im mittleren bis späteren Stressverlauf dereguliert wurden. Die Expression von ABF-Genen in früheren Zeitpunkten könnte auf deren regulatorischen Funktion im Trehalosemetabolismus hindeuten. Um genauer feststellen zu können, ob die ABF-Gene und dieses Motiv in der Regulation der Trehalosebiosynthese unter der Kontrolle von ABA stehen oder einen zweiten parallelen Signalweg stellen, sind weitere Experimente nötig.

Das MYCATRD22 (CACATG) ist ein wichtiges *cis*-Element für die Bindung verschiedener MYC-TF. MYC-Elemente funktionieren in der ABA-induzierten Genexpression ohne ein ABRE-Motiv. Obwohl dieses Motiv in allen osmotischen Stressfaktoren gefunden wurde (Tab. 3.20), zeigt es eine Reaktion, die eher auf einen ABA-abhängigen Wasserstress hindeutet (Tab. 3.21). Die ABA-Akkumulation in der Pflanzelle aufgrund des Trockenstresses führt zur Expression der MYC-Gene. Dieser erste Schritt erklärt die spätere Aktivierung von z.B. RD22, einem trockenstressinduzierten Gen, mit einer MYC-Bindungsstelle in dessen proximal-gelegenen Promotorregion.

Das dritte Motiv, EBOXBNNAPA (CANNTG, [297]) kommt in 90% der Gene vor. Dieser Fakt erklärt sich mit der Schlüsselrolle von ABA in Pflanzen. Signalgene (über 90% der trockenheitsderegulierten Kinasen) besitzen dieses Motiv in der proximalen Promotorregion. Die Kinase OsCPK7 (*Oryza sativa*) weist diese Promotorsequenz auf, wird aber durch ABA nicht induziert [1]. Das zeigt, dass das Wissen über die *cis*-Elemente allein für eine genaue Funktionsvorhersage nicht ausreichend

ist. Die Expression eines Gens ist ein komplexer Prozess, der von vielen Faktoren abhängt (Wachstumsstadium, Organelle, Wachstumsbedingungen etc.).

Über die weiteren Motive und deren Rolle in der Trockenstressantwort ist bisher nichts bekannt. Eine spezifische Stressreaktion ist zwar hier nicht erkennbar, eine relevante Funktion in der Stressregulation jedoch schon. Um diese Motive besser beschreiben zu können, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Das Wissen über die Funktion eines bestimmten Motivs kann bei der Identifizierung der Gene helfen, die an diesem Motiv binden.

Zeitreihenanalyse: Genexpression unter Trockenheitsbedingungen. Mittels Zeitreihenanalyse ist es möglich, Veränderungen im pflanzlichen Genexpressionsprofil, die aufgrund des Stresses stattfinden, zu erkennen. Diese Differenzen lassen sich zum Beispiel mithilfe der Hauptkomponentenanalyse darstellen. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, [245, 136]) stellt eine Methode dar, um multiple Varianten in einem multidimensionalen Raum (=Datensatz) zu vereinfachen bzw. um zu ermöglichen, diesen Datensatz zu veranschaulichen. Grob gesagt, wird die Korrelation mehrdimensionaler Merkmale auf drei darstellbare Vektoren minimiert. Für die Berechnung der Varianzen in der Hauptkomponentenanalyse wird angenommen, dass sich die meiste Information über einen Datensatz in der größten Streuung (=Varianz) befindet. In Abbildung 3.30.A wurde die PCA der Pflanzen unter Trockenstressbehandlung abgebildet. Auf der ersten Komponente mit 39% ist der Einfluss der Behandlung auf die Varianz zwischen den behandelten und den Kontrollpflanzen sichtbar. Mit Ausnahme von den Proben aus dem ersten Zeitpunkt (1h), die wenig Unterschied zu den Kontrollpflanzen zeigen, weisen die anderen Zeitpunkte einen deutlichen Abstand zwischen der Behandlung und der Kontrolle auf. Auf der zweiten Achse wird eine Unterteilung der Proben nach dem Zeitfaktor sichtbar. Die Zeitpunkte 1h sowie 24h und 48h bilden gemeinsam eine Gruppe. Dies deutet auf einen möglichen zirkadianischen Effekt hin. Die Proben nach 3h stehen separat als eine Gruppe. Die Proben der letzten zwei Zeitpunkte (6h und 9h) gruppieren sich zu einem getrennten Cluster. Der Abstand zwischen behandelten und Kontrollexperimenten wächst mit der Zeit. Daraus lässt sich schließen, dass der Stresslevel im Vergleich zur Zeit kontinuierlich wächst (Abb. 3.30.A). Der kleinere Abstand nach 48 Stunden liefert eine Erklärung für die relativ kleine Anzahl an differentiell regulierten Genen zu diesem Zeitpunkt. Das allgemeine Profil des Expressionsverhaltens aller trockenheitsderegulierten Gene zeigt eine konstante Erhöhung der Expression bis 24h gefolgt von einer deutlichen Intensitäts-senkung im letzten Zeitpunkt (48h). Abbildung 3.30.B zeigt einige Beispiele solcher Gene mit einer wichtigen Rolle in der Trockenstressreaktion der Pflanze [279, 122].

Unter den angegebenen Parametern wurde der Expressionsverlauf in vier Phasen unterteilt. In der ersten Phase (1h und früher) wurden überwiegend regulatorische Proteine exprimiert. Dabei handelt es sich um Gene für die ABA-Biosynthese (z.B. NCED3) oder verschiedene Transkriptionsfaktoren für den ABA-abhängigen Regulationsweg (ABRE, NAC, HB) sowie den ABA-unabhängigen Weg (AP2/ERF oder ZFHD). Weitere regulatorische Elemente wie Phosphatasen und Kinasen zeigen in den behandelten Proben bereits nach einer Stunde eine vielfach stärkere Expression. Dazu gehören sowohl bereits bekannte Phosphatasen, wie z.B. ABI1 oder die RPK1-Kinasen, als auch noch bisher unbekannt Kinasen.

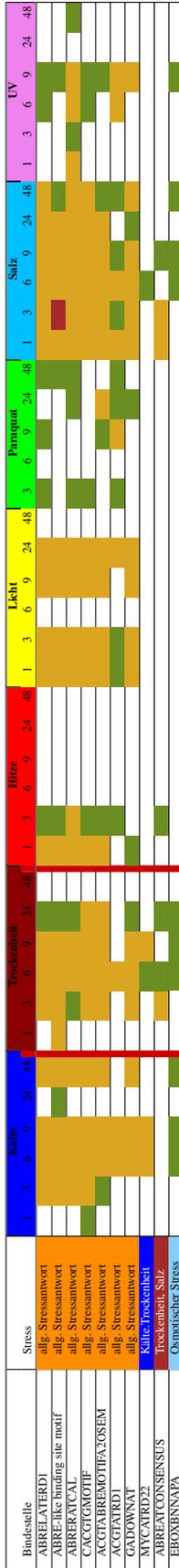


Tabelle 3.20: Die Analyse der Transkriptionsfaktorenbindstellen der hochregulierten Gene unter Trockenstress. Die Analyse (FET; Cutoff 10^{-3} , $p \leq 0.01$) zeigt eine starke Beteiligung des Phytohormons ABA. Während acht der neun hier ausgeführten Motive von ABA-abhängigen Genen gebunden wurden [323, 154, 152], fungiert ACGTABOX als eine Bindestelle für die AP2/ERE/ERF TF-Familie. Mitglieder dieser Familie wurden zum Teil zum ABA-unabhängigen Signalweg zugeordnet. Die letzten drei Motive zeigen eine stresspezifische Antwort auf osmotischen Stress. Das Motiv EBOXBNNAPA beinhaltet Gene, die in den späteren Stressphasen aktiviert wurden. (p-Values: $1E^{-20}$, $E^{-20} \geq p < E^{-5}$, $p \geq E^{-5}$)

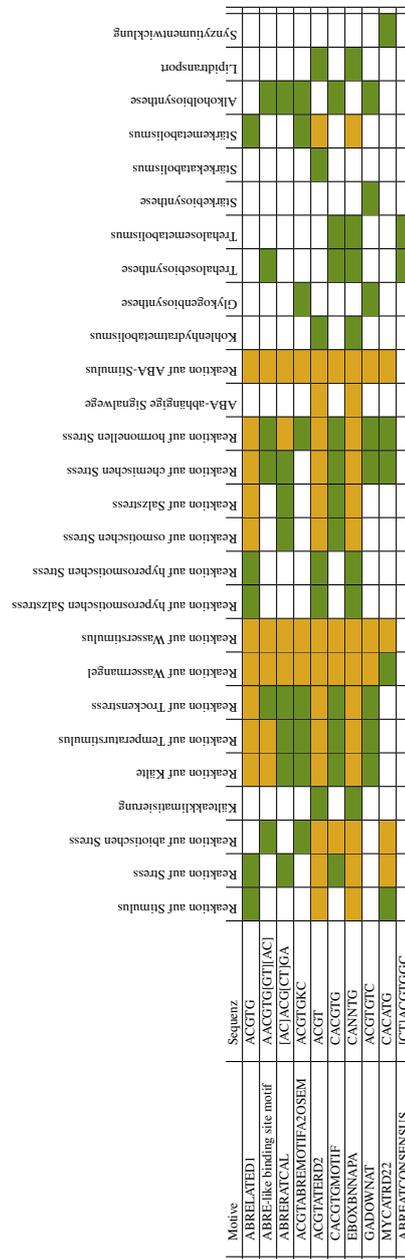
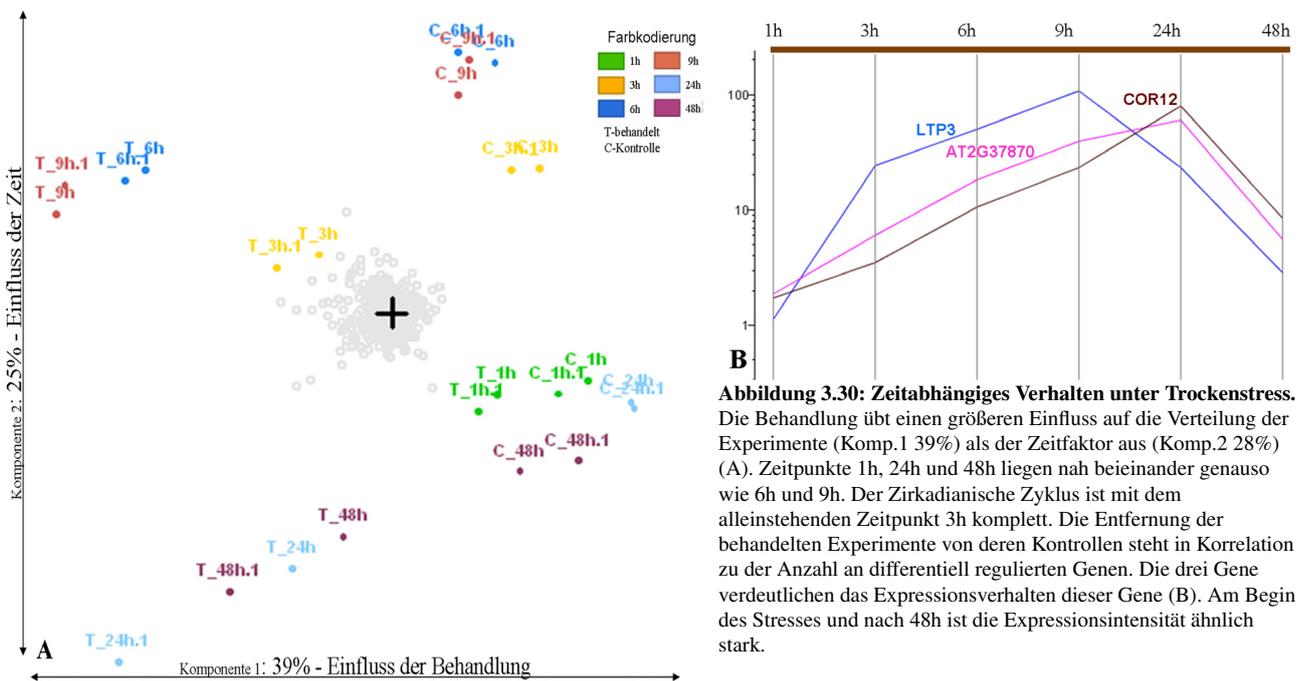


Tabelle 3.21: Das Vorkommen biologischer Funktionen unter Trockenstress. Die aufgelisteten Promotordomänen wurden bei einem exakten Test nach Fisher basierend auf GO-Annotationen gefunden [311]. Gesucht wurden überrepräsentative biologische Funktionen in der Gruppe der trockenstressregulierten Gene mit einem bestimmten Bindestellenmotiv. Die Analyse der GO-Terme korreliert mit der Annahme der allgemeinen Stressantwort. Abiotischer Stress, chemischer Stress und Hormonantwort (ABA) wurden in neun von zehn Motiven beobachtet, zusammen mit verschiedenen metabolischen Prozessen in unterschiedlichen Zusammensetzungen (Trehalose, Stärke, Transport, Entwicklung). Interessant für die ABA-unabhängigen Signale ist das letzte Motiv, dass nur beim Trehaloseprozessen vorkommt und keinen Treffer mit ABA aufweist. (p-Values: $1E^{-20} \geq p < 1E^{-3}$, $p \geq 1E^{-3}$)



Ein weiterer Beweis für die ABA-Beteiligung in der Kontrolle der Stressantwort ist die Analyse des positiven Expressionsverhaltens deregulierter Gene zwischen 1h und 24h. Eine Anreicherungsanalyse der GO-Annotationen weist eine Anhäufung von knapp 60% für Gene auf, deren Expression durch ABA reguliert wird (Tab. 3.22). Die Analyse der signifikant regulierten Gene (R-Paket siggenes [319]) fand verschiedene ABA-abhängige, hochregulierte Gene im ersten Messpunkt. NCED3, eines der wichtigen Gene in der ABA-Biosynthese wurde bereits früher exprimiert und weist im ersten Zeitpunkt eine über achtfache Expressionsintensität im Vergleich zu den Kontrollexperimenten auf. Weitere ABA-kontrollierte Transkriptionsfaktoren wurden relativ schnell nach Stressbeginn stärker exprimiert.

In der zweiten Phase wurden weitere regulatorische Elemente exprimiert. Transkriptionsfaktoren der Familien MYC, MYB, bZIP und bHLH, die das ABRE-Motiv in ihren proximalen Promotorregionen besitzen, wurden hier reguliert. Zusätzlich wurden Gene mehrerer funktioneller Proteine exprimiert. Lipidtransportproteine (LTPs) und weitere Transporter (AA, Ionen) sowie calciumabhängige Signalmoleküle wurden hochreguliert. Ein interessanter Punkt ist die Herabregulierung von Genen, die durch Auxin induziert werden (GH3, IAA). Die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen auf eine mögliche Rolle dieser Gene in der Stressregulation mit einer antagonistischen Wirkung zu ABA hin. Die genaue Funktion dieser Gene unter Trockenheit bzw. deren Kontrolle durch die Phytohormone bedarf weiterer Experimente.

In früheren Analysen wurde das Zusammenspiel verschiedener Phytohormone in der Regulation des Pflanzenwachstums nachgewiesen [282, 98]. Der Transkriptionsfaktor MYB96 ist bekannt für seine regulatorische Funktion im Trockenstress in der Wurzel. Die erhöhte Expression in dieser Arbeit deutet darauf hin, dass MYB96 nicht nur in den Wurzeln, sondern auch im Spross eine Funktion ausübt. Gene der Auxinbiosynthese werden von ABA kontrolliert. Dieses Resultat verstärkt die Annahme, dass Gene im Auxinmetabolismus (SAUR-Gene, IAA-Familie und weitere Gene wurden unter den hier angesetzten Stressbedingungen herabreguliert) und in der ABA-Biosynthese (ABF-, AREB- oder ABA-Genfamilien werden intensiver exprimiert unter Trockenstress) ein antagonistisches Ver-

Biologische Funktion	Anzahl	p-Value
Antwort auf Stimuli	80	1.58E-05
chemischer Stress	52	7.64E-08
Hormonstimulus	29	1.37E-04
ABA-Antwort	15	9.45E-06
abiotischer Stress	31	2.23E-04
Lichtstress	7	5.91E-05
oxidativer Stress	13	3.90E-04
Hitzestressantwort	9	3.82E-04
Temperaturstimuli	15	8.60E-04
Reaktion auf Wassermangel	11	8.48E-06
Stressreaktion	47	8.63E-08
Wasserstress	12	3.18E-06
Sekundärmetabolismen	22	4.56E-06
Flavonoidbiosynthese	6	2.02E-04
Phenylpropanoidmetabolismus	12	1.75E-05
Aminosäurederivate	13	2.80E-04
Lipidtransport	9	4.09E-04
Cellulose, Zellwandsynthese	4	1.08E-04
Schwefelassimilation	4	1.49E-04

Tabelle 3.22: Positive zeitabhängige Expression signifikant deregulierter Gene unter Trockenheitsbedingungen. Obwohl die Anzahl der deregulierten Gene unter Trockenstress relativ gering bleibt, findet eine kontinuierliche Stressintensivierung während der Stressbehandlung statt. Trockenheitsbedingungen führen zur Aktivierung mehrerer Gene in verschiedenen biologischen Funktionen. Die stärkste Antwort zeigen die Gene für die allgemeine Stressantwort. Weitere Gene verschiedener metabolischer Prozesse weisen ebenfalls eine kontinuierliche Expressionssteigerung im Stressverlauf auf, deren Zahl ist aber vergleichsweise gering.

halten zueinander aufweisen. Die Identifizierung dieser Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Phytohormonen werden dazu beitragen, das Verständnis über die Stressantwort auf abiotischen Stress zu vervollständigen.

In der dritten Phase (6h-9h) wurden viele Gene kontinuierlich stärker exprimiert und haben jetzt ihr Expressionsmaximum erreicht. Während in den ersten zwei Phasen hauptsächlich Gene für die Regulation der Stressantwort exprimiert wurden, findet man in dieser Phase auch solche Gene, die für die Aufrechterhaltung der metabolischen Prozesse und zellulären Strukturen zuständig sind. Gene der strukturellen Integrität der Zellwand (Pektine, Fasciline) oder aus dem Phospholipidmetabolismus wurden angereichert. Weitere funktionelle Proteine z.B. für die Osmolytenbiosynthese [Aldehyde (ALDH), Proline (Prolyl, Prolinoxidase) oder Zucker-Synthasen] oder Schutzproteine gegen Stress wurden in diesem Stresszustand stärker exprimiert. Chaperone, die bei der Proteinfaltung helfen, verschiedene LEA Proteine oder Ubiquitine, die falsch gefaltete Proteine zum Abbau markieren, wurden in dieser Phase intensiver exprimiert.

Interessanterweise wurden Gene, die an der Einleitung des programmierten Zelltodes beteiligt sind, bereits in dieser Phase signifikant hochreguliert (STP13 [231], Bax Inhibitor, PR-Proteine). Anhand der Ergebnisse kann man erkennen, dass die lebenserhaltenden Systeme noch immer der Stressbelastung Stand halten. Mehrere Signal- und Transportgene wurden exprimiert. Verschiedene metabolische Prozesse wurden dereguliert. Der tatsächliche Grund für die Expression der PCD-Gene zu diesem Zeitpunkt sollte deshalb weiter untersucht werden. Der ABA-Einfluss ist auch in diesen Phasen extrem stark. Die Gene mit einem transienten Expressionsverlauf (d.h. sie weisen ein Intensitätsmaximum in einem der mittleren Zeitpunkte auf) wurden in acht Clustern zusammengefasst (Tab. 3.23). In fünf der acht Gruppen wurden überwiegend Gene gefunden, die unter ABA-Kontrolle stehen.

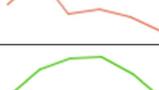
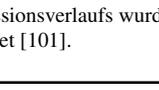
Nr.	Anzahl	Expressionsmuster	biologische Funktionen
1	48		abiotischer, chemischer Stress [ALDH7B4, RD29A/B, ERD7, COR15A]
2	8		Sekundärmetabolismen [DREB1A, Pektine, GOLS3]
3	9		Transkriptionsfaktoren, Energiemetabolismus [CYP Proteine, WRKY]
4	29		abiotischer Stress, Reaktion auf ABA [LTP3, P5CS, ABF3]
5	7		Keine Auffälligkeiten in dieser Gruppe gefunden
6	17		abiotischer Stress, Reaktion auf ABA [COR Gene, XERO2, KIN1]
7	7		PCD (STP13), Reaktion auf ABA (ABI1).
8	24		abiotischer Stress, Reaktion auf ABA [ABI2, RD26, HB12, HB7]

Tabelle 3.23: Transient exprimierte Gene unter Trockenstress. Die Analyse der transient exprimierten Gene weist eine starke abiotische Stressantwort verschiedener Faktoren auf. Es wurde keine spezifische Trockenstressantwort identifiziert, dafür ist die Kontrolle des Phytohormons ABA sehr deutlich. Es handelt sich um Gene mit einer Funktion in mehreren Signalwegen und allgemeinen abiotischen Stressreaktionen. Die Analyse des transienten Expressionsverlaufs wurde mittels SAMR Algorithmus erstellt [319, 224]. Die K-Means Analyse wurde mit einer positiven Korrelation Distanzmatrix errechnet [101].

Die letzte Phase beinhaltet die Gene der Zeitmessungen 24h und 48h. Nach 24h erreicht die Stressreaktion ein Intensitätsmaximum. In dieser Phase überwiegt die Anzahl der Gene, die an der Regulation von Sekundärmetaboliten beteiligt sind. Im Gegensatz zu den früheren Zeitpunkten wurden in dieser Phase mehrere dieser Gene stärker dereguliert. Verschiedene Gene mit einer Funktion in der Zuckerabbauregulation wurden intensiver exprimiert. Dagegen wurden Gene, die mit den Energiemetabolismen verknüpft sind, herabgesetzt. Während Gene der Proteindegradation, Entgiftung und Proteolyse (Ring H2, WD-40, GLX) hochreguliert wurden, ist die Expression von Genen mit einer Funktion in der Regulation von RNA bzw. DNA gesunken. Gene der Zellwandmodifizierung wurden hier ebenfalls herabreguliert. Infolgedessen verliert die Zelle ihre strukturelle Integrität. Dies wäre eine Erklärung für die Einleitung des programmierten Zelltodes.

Aufgrund der geringen Anzahl an differentiell regulierten Genen nach 48h kann keine spezifische Aussage über die Reaktion der Pflanze nach einem langanhaltenden Trockenstress getroffen werden. Trotz eines phänotypisch stark ausgeprägten Stresslevels wurden mehrere Transkriptionsfaktoren weiterhin hoch exprimiert. DREB1A, bekannt durch seine Deregulation unter Kältestress, wurde hier erneut exprimiert. Seine Funktion bei diesem Stress kann bisher nur vermutet werden. Eine mögliche Rolle dieses Gens könnte in der Inhibierung photosynthetischer Prozesse liegen (bereits unter Kältebedingungen gezeigt [262]). Die Wichtigkeit der verschiedenen TF-Familien (MYB, MYC, AP2/ERF u.v.m) in der Regulation des abiotischen Stresses ist bekannt. Bisher konnten nur wenige einzelne Faktoren einer spezifischen Rolle zugeordnet werden. Hier wurde aber gezeigt, dass unter langandauerndem Trockenstress mehrere Transkriptionsfaktoren noch eine wichtige Rolle spielen. Als ein weiterer Schritt bei der Analyse der Regulation und der Stressantwort wird die Identifizierung

Intervall	Reaktion auf Stimuli	Stressantwort - allgemein	Reaktion auf abiotischen Stress	Kälteakklimatisierung	Reaktion auf Kälte	Reaktion auf Hitze	Antwort auf Temperaturstimuli	Salzstressantwort	Reaktion auf Wasserstimuli	Reaktion auf Wassermangel	Reaktion auf intensives Licht	Lichtstressantwort	Antwort auf osmotischen Stress	Reaktion auf biotischen Stress	Reaktion auf Organismen	Abwehrreaktion	Pilzabwehrreaktion	Reaktion auf Pilze	Reaktion auf chemischen Stress	Reaktion auf ABA-Stimulus	Hormonestimuli	Lipidtransport
3h-1h	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6h-3h	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9h-6h	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
24h-9h	In diesem Abschnitt wurden keine differentiell regulierten Gene gefunden																					
48h-24h	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Tabelle 3.24: Die Analyse der direkt benachbarten Zeitpunkte auf Expressionsveränderungen. Der paarweise Vergleich von Zeitpunkten miteinander unterstützt die Aufteilung der Experimente in verschiedenen Phasen. In den Anfangsphasen ruft der Stress eine Reaktion mehrerer metabolischen Prozesse hervor. Die Reaktion auf biotische Stressfaktoren, verschiedene hormonelle Reize aber auch abiotischen Stressantworten sind vertreten. Im weiteren Verlauf wurde die Reaktion etwas spezifischer. Die späteren Zeitpunkte zeigen eine Anreicherung der Gruppen des osmotischen Stresses. Als der wichtigste Hormon in der Reaktion auf Trockenheit ist ABA-Stimulus an allen Zeitpunkten zu sehen. Die einzelnen Gruppen wurden mittels LIMMA Algorithmus berechnet [294]. Gene mit einem p-Value ≥ 0.01 und einer Foldinduktion ≤ 2 wurden verworfen. Die GO-Annotationen wurden mittels Fisher's exact Test bestimmt [75].

dieser regulatorischen Mechanismen eine wichtige Rolle spielen können.

Gene für die Regulation der Ribosombiosynthese oder RNA- bzw. DNA-Prozessierung wurden weiterhin transkribiert. Beim direkten Vergleich zwischen den letzten zwei Zeitpunkten wurden mehrere deregulierte Gene der allgemeinen Stressantwort identifiziert (Tab. 3.24). Darunter fallen z.B. Transkriptionsfaktoren (MYB, HB, Dehydrin/LEA) oder Gene mit einer Schutzfunktion (Osmolytenakkumulation, Proteinabbau oder -faltung). All diese Faktoren deuten darauf hin, dass die Pflanze ihren Proteinhaushalt immer noch anzupassen versucht, um den Stress besser überstehen zu können. Der Stress wurde noch aktiv bekämpft. Das Erscheinen bestimmter Gene mit einer Funktion in der Einleitung des programmierten Zelltodes bzw. in den Entgiftungsprozessen geben bereits erste Hinweise darauf, dass bei einer längeren Stressbehandlung die Pflanze der Stressintensität nicht mehr Stand halten kann.

In jedem Zeitpunkt der Trockenstressanalyse kann gezeigt werden, dass die differentiell regulierten Gene überwiegend durch ABA kontrolliert wurden. Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass ABA fast 90% der unter Trockenheit deregulierten Gene direkt oder indirekt kontrolliert [122]. In der Analyse der Expressionsveränderungen über die Zeit wurde der Einfluss des Phytohormons sehr deutlich gemacht. In allen Zeitpunkten wurde eine signifikante Expressionsänderung solcher Gene beobachtet. Die Trennung der ABA-abhängigen und -unabhängigen Signalwege kann nicht eindeutig definiert werden. Bestimmte Gene sind für ihre Koregulation bekannt. RD29A weist in seinem Promotorbereich sowohl das DRE- als auch das ABRE-Element auf. Frühere Analysen haben nachgewiesen, dass RD29A nur durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an beiden Motiven im proximalen Promotorbereich seine vollständige Funktion ausüben kann [225]. Die Antwort der pflanze auf die unterschiedlichen Stressfaktoren durch die verschiedenen Transkriptionsfaktoren scheint verflochtener zu sein, als bisher bekannt ist. Die fortwährende ABA-Anwesenheit in allen Schritten der Stressreaktion bekräftigt die gegenseitige Abhängigkeit dieser beiden TF-Gruppen weiter.

Die Analyse der Trockenstressantwort hat in dieser Arbeit eine geringe Anzahl an deregulierten Genen identifiziert. Dennoch wurden die Gene sehr intensiv exprimiert. Die Stärke des Stresses über-

wiegt fast alle anderen Stressfaktoren (mit Ausnahme von Hitze, Abb. 4.2 auf Seite 105). Die Analyse zeigt eine Schlüsselrolle für das Phytohormon ABA in der Regulation der Stressantwort und der Kontrolle mehrerer Prozesse unter Stressbedingungen. Hinzu kommt das Zusammenspiel zwischen ABA, Auxin und weiteren Phytohormonen. Aufgrund der geringen Anzahl an differentiell regulierten Genen konnten hier keine stressspezifischen, signifikant angereicherten Motive für Transkriptionsfaktorbindungen gefunden werden. Fast alle identifizierten Motive enthalten ABA-Motive in ihren Promotorbereichen. Diese Gruppen wurden als allgemeine Stressantwort deklariert, weil sie in allen Stressfaktoren und zu fast allen Zeitpunkten beobachtet wurden. Die Analyse der zeitabhängigen Stressantwort und der angereicherten funktionellen Annotationen haben wieder ABA als das hauptmitwirkende Element in der Trockenheitsreaktion identifizieren können. Die ABA-Akkumulation führt zur Inhibierung verschiedener metabolischer Prozesse (u.a. Energie-, Kohlenhydrat-, Auxinmetabolismus). Die Analyse hier zeigt die Beteiligung von ABA in der Regulation der Gene mit einer Funktion in der Einleitung der Pathogenese. PR-Gene (z.B. PR-1, 4,5-fach nach 24h oder BGL2, 6-fach nach 24h) sowie Gene der Thaumatin-Familie (AT1G20030, 4,4-fach oder AT4G36010, 4-fach beide nach 6h) wurden unter Trockenstress in den späteren Zeitpunkten hoch exprimiert.

3.3.3 Die Analyse der pflanzlichen Reaktionen auf UV-B Stress

Aufgrund der klimatischen Veränderungen kommt es häufiger vor, dass Pflanzen UV-B-Stress ausgesetzt werden. Der UV-B-Stress verändert die Expression mehrerer Gene und den Verlauf verschiedener Prozesse in der Pflanze. Die Absorption von UV-Lichts hat nicht nur auf die DNA- (z.B. die Bildung von Thymindimeren) oder RNA-Synthese, sondern auch auf die Proteinsynthese und die Lipidstruktur in der Pflanze einen starken Einfluss. UV-Licht führt zu der Vernetzung von ribosomalen Proteinen mit der RNA-Struktur und damit zur Inhibierung der Transkription. Die Pflanzen wirken dem entgegen, indem sie die Translation ribosomaler Proteine intensivieren.

Die Identifizierung von Markergenen in unter UV-Licht gestressten Pflanzen. Die zellulären Reaktionen pflanzlicher Zellen auf den UV-Stress werden allgemein als UV-Antwort definiert. Dabei bewirken verschiedene Aktivatoren die Bildung von ROS-Elementen. Diese sekundären Botenstoffe aktivieren eine Reihe von Transkriptionsfaktoren [276, 177]. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass auch die Auswirkungen des UV-Stresses auf die Pflanze keinesfalls unspezifisch sind. Die Pflanze besitzt ebenfalls eine spezifische UV-Antwort [190]. Diese besteht aus der Aktivierung von verschiedenen primären (Transkriptionsfaktoren, MAP-Kinasen) und sekundären (ROS-Elemente, Antioxidanten) Elementen. In dieser Arbeit wurden diese Fragestellungen nachgegangen. Die UV-Lichtreaktion der Pflanzen wurde hier untersucht, um eine mögliche spezifische Stressantwort auf UV-B Licht zu identifizieren.

Deregulierte Gene unter UV-Stress wurden in drei Kategorien mit unterschiedlichen Expressionsintensitäten unterteilt. Das Expressionsverhalten in dieser Analyse deutet eher auf ein hohes Stressintensitätslevel hin. UV-Marker, die für deren Aktivität bei höheren Strahlungsdosen bekannt sind, wurden hier (vor allem in den späteren Zeitpunkten) stark exprimiert (Abb. 3.31).

MEB5.2 (AT3G17800), PDX1 (AT5G01410) und UBQ3 (AT5G03240) (Tabelle unter Abb. 3.31) wurden bereits bei niedrigen UV-Strahlen exprimiert [320]. Die differentielle Expression dieser Gene ist relativ schwach. Dagegen weisen die Gene PR-1 (AT2G14610), PDF1.2 (AT5G44420) und PR-5 (AT1G75040) eine viel stärkere Expression auf. Sie sind für ihr Verhalten unter starker UV-Strahlung bekannt. Diese Gene erreichen ihr Intensitätsmaximum nach 48h. Das lässt vermuten, dass sie eine mögliche Funktion bei der Reaktion der Pflanze auf längere Stressperiode mit UV-Strahlung inne

Genname	AGI Nummer	Bezeichnung	Foldinduktion (Zeit)
Reaktion auf Stress			
MYB77	AT3G50060	MYB protein	4,07 (1h)
TET8	AT2G23810	Tetraspanin8	7,52 (1h)
SAG21	AT4G02380	Senescence-associated gene 21	23,31 (3h)
SAG101	AT5G14930	Senescence-associated gene 101	8,88 (24h)
ATCAMBP25	AT2G41010	Calmodulin (cam)-binding protein	12,53 (1h)
Proteindegradation			
bZIP60	AT1G42990	Basic region/leucine zipper motif 60	7,69 (3h)
Zn-finger	AT5G27420	C3HC4 type ring finger	35,51 (6h)
SBT3.5	AT1G32940	Subtilase	24,53 (24h)
MC8	AT1G16420	Metacaspase 8	10,27 (1h)
Entwicklungsprozesse			
F24B22.110	AT3G54150	embryo-abundant protein-related	45,9 (6h)
nodulin family protein	AT2G39210	nodulin family protein	25,63 (48h)
F13H10.7	AT2G41380	LEA protein-related	29,12 (6h)
Signalproteine			
WAKL7	AT1G16090	Wall-associated kinase 7	7,75 (6h)
MIJ24.17	AT5G39670	Calcium binding protein	67 (24h)
CPK28	AT5G66210	Calcium-dependent PK	15,2 (1h)
CPK6	AT2G17290	Calcium-dependent protein kinase 6	6,83 (24h)
Aminosäure- und Sekundärmetabolismen			
ASA1	AT5G05730	Anthranilate synthase component I-1	9,8 (6h)
PAD3	AT3G26830	Phytoalexin deficient 3	289,56 (3h)
GSTU22	AT2G29460	Glutathione s-transferase 22	92,27 (3h)
RNA-Prozesse			
CAF1	AT3G44260	CCR4-associated transcription complex	22 (1h)
SigE	AT5G24120	RNA polymerase sigma subunit E	2,09 (9h)
Zellwandmodifizierung			
AGP10	AT4G09030	Arabinogalactan protein 10	7,8 (1h)
TCH4	AT5G57560	touch 4	20,84 (1h)
Hormonmetabolismus			
ABA3	AT1G16540	ABA deficient 3	4,46 (6h)
T19L5.4	AT5G13200	ABA-responsive protein-related	18,2 (24h)
TIFY10	AT1G19180	Jasmonate signalling repressor	67,25 (3h)
F25G13.70	AT4G12980	Auxin-responsive protein	1/ 10,08 (24h)
SAUR	AT4G38840	Auxin-responsive protein	1/17,91 (6h)
AXR3	AT1G04250	Auxin resistant 3	1/7,21 (6h)
PIN7	AT1G23080	Auxin transport protein	1/1,63 (6h)
Energiemetabolismus			
LHCA6	AT1G19150	Photosystem I light harvesting complex gene 6	1/7,94 (24h)
PSBQ	AT1G14150	Photosystem II subunit q-2	1/12,01 (9h)
CYP71b4	AT3G26280	Cytochrome P450, family 71	1/4,88 (6h)
Kohlenhydratmetabolismus			
TPS8	AT1G70290	Trehalose phosphatase/synthase 8	1/3,13 (3h)
AGAL2	AT5G08370	Alpha-galactosidase 2	1/3,21 (6h)
SEX1	AT1G10760	Starch excess 1	1/6,49 (6h)

Tabelle 3.25: Differenziell regulierte Gene unter UV-Stress. Im frühen Stressestadien wurden metabolische Prozesse zum Schutz gegen den Stress aktiviert (wie z.B. DNA- oder RNA-Modifizierungsprozesse). Die Seneszenzregulation wurde bereits nach 1h hoch exprimiert. Während Gene des ABA- und JA-Katabolismus intensiver exprimiert wurden, wiesen verschiedene haushaltsmetabolischen Prozesse bei längerem Stressdauer eine sinkende Intensität auf (Kohlenhydratmetabolismus, Energiemetabolismus, Auxinmetabolismus).

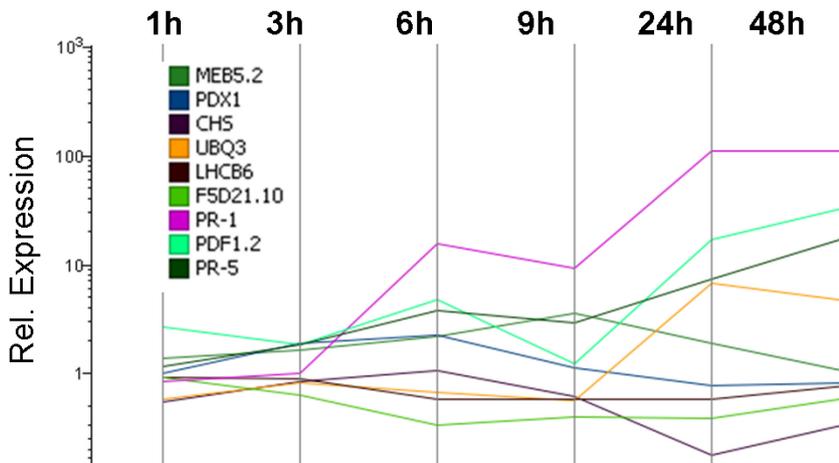


Abbildung 3.31: Das Expressionsverhalten deregulierter UV- Markergene. Die langsam steigende Intensität deutet auf eine spätere Stressantwort auf UV-B-Stress hin. Gene, deren Expression unter hoher Strahlungsintensität bekannt sind (PR-Gene, PDF1.2) weisen hier eine sehr hohe Deregulation auf. LHCB6, ein weiteres Markergen für UV-Stress zeigt in dieser Analyse keine signifikante Expression. Dargestellt wird die zur Kontrolle relative Expression in den unterschiedlichen Zeitpunkten.

Gene	AGI	Funktion	FC [Zeit]
F5D21.10	AT1G51400	unbekannt	1/3.1 [6h]
PDX1	AT5G01410	Zelluläre Abwehr	2.2 [6h]
MEB5.2	AT3G17800	Stressantwort	3.4 [9h]
UBQ3	AT5G03240	Sekundärmetabolismus	6.5 [24h]
CH5	AT5G13930	Stressantwort	1/5.8 [24h]
PR-1	AT2G14610	Pathogenese	107 [48h]
PDF1.2	AT5G44420	Zelluläre Abwehr	33.0 [48h]
PR-5	AT1G75040	Pathogenese	17.3 [48h]
LHCB6	AT1G15820	Energiemetabolismus	nicht DE

haben.

Tabelle 3.25 stellt weitere Gene dar (z.B. SAG21, SAUR, F24B22.110, SEX1, TIFY10 oder SBT3.5), deren Expression unter UV-Stress signifikant dereguliert wurden. Die in der Tabelle gezeigten Gene wurden verschiedenen metabolischen und morphologischen Prozessen zugewiesen. Die Bekämpfung von ROS-Elementen und die Einleitung des PCD sind als Reaktionen auf UV-Stress bereits bekannt (SAG-Genfamilie, [62, 105]). Während He et al. [105] nur ein Caspase-Gen (MC8) identifiziert haben, wurden in dieser Arbeit zwei weitere Gene, eins davon sogar UV-spezifisch, gefunden (MC3 und LOL3), deren Reaktion auf UV-Stress bisher nicht bekannt war. Mehrere Transkriptionsfaktoren sind in die Stressantwort involviert. WRKY-Gene (WRKY33, WRKY70, WRKY6 u.v.m) beeinflussen die Seneszenz und die Reaktion auf den Pathogenangriff [178, 67]. Bekannt sind auch Gene der MYB-TF Familie, deren Funktion in der Regulation der Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese bestehen (z.B. MYB77 in Tab. 3.25) [185, 263]. In dieser Analyse wurden 276 Transkriptionsfaktoren aus unterschiedlichen Familien gefunden, die unter UV-Stress dereguliert wurden. Für viele dieser Gene wurde bisher weder eine Funktion noch deren Zielgene identifiziert. Einige Gene weisen sogar eine UV-spezifische Reaktion auf.

Für das menschliche Genom und das anderer Säugetiere ist bereits bekannt, dass Zinkfingerproteine eine wichtige Rolle in der Reaktion auf UV-Licht spielen [218]. Die durch den Stress entstehenden Sauerstoffradikale bewirken die Entstehung von DNA-Läsionen. In dieser Arbeit wurden Gene mehrerer Zn-Fingerproteine identifiziert (z.B. AT5G27420 in Tab. 3.25 oder AT2G40140 in Abb. 3.32), welche unter UV-Stress hochreguliert wurden. Manche dieser Gene weisen eine spezifische Reaktion für diesen Stress auf. Diese Zn-Fingerproteine binden an DNA und RNA und beeinflussen somit die Transkriptions- und Translationsprozesse in der Zelle. AT2G40140 ist ein Zinkfingerprotein, welches zusammen mit WRKY-TF korreguliert wird [248]. AT3g55980 (in Abb. 3.32) dagegen weist eine regulatorische Funktion in der Reaktion auf Trockenstress auf [142]. Wie in Abbildung 3.32 abgebildet

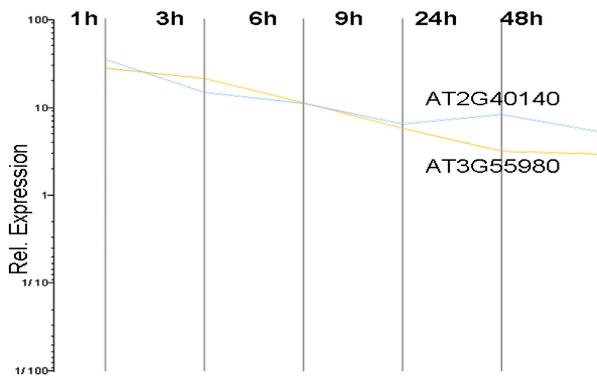


Abbildung 3.32: Zinkfinger-TF Familie

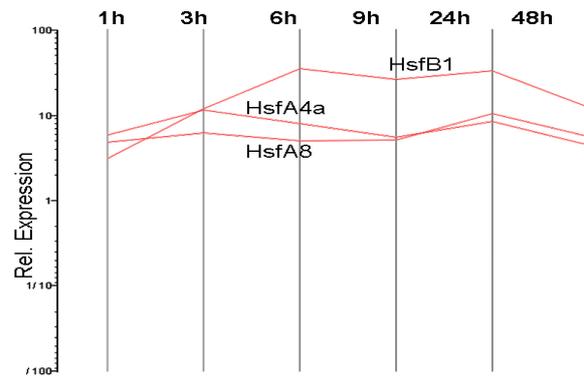


Abbildung 3.34: Reaktion der HSF-Gene

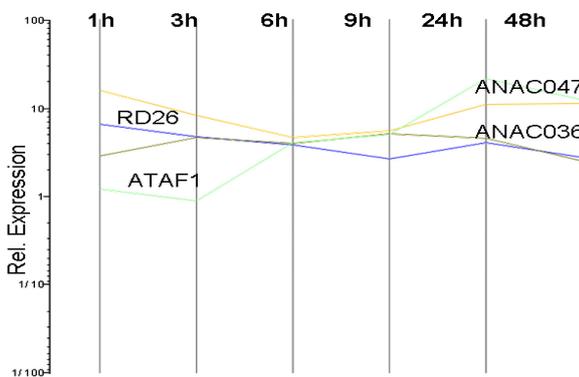


Abbildung 3.33: Die Expression der NAC-Gene

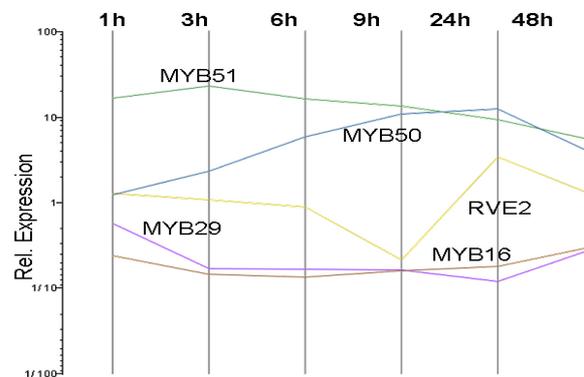


Abbildung 3.35: Deregulation der MYB-TF

Die Deregulation der Transkriptionsfaktoren unter UV-Stress. Diese Faktoren weisen ein vielfältiges Expressionsverhalten auf. Zn-Finger wurden bereits früh im Stressverlauf stark exprimiert. Die Intensität sinkt mit fortlaufendem Stressverlauf. Die Expression der Hitzeschockfaktoren begann etwas schwächer, steigt aber bei einem länger anhaltenden Stress. Die MYB-Transkriptionsfaktoren weisen ein ambivalentes Expressionsverhalten auf. Einige wurden herabreguliert, andere dagegen stärker exprimiert. Einige NAC-Gene wurden relativ konstant exprimiert. Die Expression des ATAF1, eines trockenstressinduzierten Gens verändert sich um mehr als einen Zehnerfaktor im Stressverlauf.

wurde, weist die Expression dieser zwei Gene sowie weiterer in dieser Arbeit identifizierter Zn-Gene eine hohe Intensität in den früheren Zeitpunkten auf. Das deutet auf eine mögliche Funktion in der primären Stressantwort hin.

Als Reaktion auf UV-Stress wurden über 270 verschiedene deregulierte Transkriptionsfaktoren identifiziert. Bei 38 Genen wurde sogar eine stressspezifische Expression nachgewiesen. Dabei handelt es sich um Gene aus über 50 verschiedenen Familien. Mehrere dieser Gene wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal mit der Reaktion auf UV-Stress in Verbindung gebracht. Darunter befinden sich auch Hitzeschockfaktoren (Abb. 3.34), NAC-Gene (Abb. 3.33) oder Gene aus der MYB-Familie (Abb. 3.35). Die erhöhte Expression der Hitzestressfaktoren aufgrund des UV-Stresses wurde bereits dokumentiert [305]. HsfB1 ist bekannt für seine Rolle als Aktivator für die Erhöhung der DNA-Bindeaffinität anderer Transkriptionsfaktoren [316]. Die Resultate in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass HsfB1 auch eine Funktion bei der Regulation der Reaktion auf UV-Stress besitzt. HsfA4a und HsfA8 wurden unter UV-Stress intensiver exprimiert. Gleichzeitig werden verschiedene Hitzeschockproteine durch UV-Stress induziert (HSP70, HSP90, aber auch mitochondriale HSP Proteine wie z.B. HSP23). Die Resultate in dieser Arbeit lassen vermuten, dass dies vermutlich durch die Expressionserhöhung der Hsf-Gene HsfA4a oder HsfA8 geschieht. Miller & Mittler [208] haben bereits die Hypothese gestellt, dass die Hitzeschockfaktoren als H_2O_2 -Sensor dienen könnten. Das Expressions-

verhalten dieser Hsfs unter UV-Bedingungen unterstützt diese Annahme.

Die Gene der NAC-Familie sind an wichtigen Funktionen in verschiedenen pflanzlichen Entwicklungsstadien beteiligt [236], z.B. beim Auxinsignalübertragungsweg und bei der Stressreaktion auf Trockenheit [236, 345]. Mehrere NAC-Gene in den verschiedenen Untersuchungen wurden identifiziert, die unter UV-Stress signifikant differentiell reguliert worden sind (wie z.B. RD26 oder ATAF in Abb. 3.33). Einige Gene wie z.B. ANAC047 wurden sogar ausschließlich unter UV-Stress exprimiert. RD26 und ATAF1 (Abb. 3.33) wurden bei der Regulation der Trockenstressantwort differentiell reguliert. In dieser Arbeit weisen sie eine stark erhöhte Expression unter UV-Bedingungen auf. Die Rolle der NAC-Faktoren unter UV-Stress wurde bisher noch nicht identifiziert. Eine mögliche Funktion, welche die Expression in späteren Zeitpunkten erklären könnte, ist die Regulation der Seneszenz [346].

Die MYB-Gene repräsentieren eine große Familie mit Einfluss bei mehreren Funktionen, z.B. im zellulären Zellzyklus, in der Regulation metabolischer Prozesse und der Kontrolle der Apoptose [234]. Die MYB-Gene reagieren auf unterschiedliche Weise. Während einige eine frühe Expression aufweisen (wie z.B. MYB51), wurden andere Gene erst zu späteren Zeitpunkten aktiv (MYB50) oder sogar reprimiert (MYB29 oder MYB16). Das Gen MYB51 ist bereits für seine Rolle in der Regulation verschiedener Sekundärmetaboliten [87], die wiederum als Schutzmechanismus gegen externe Angriffsfaktoren dienen, bekannt. MYB50 dagegen reduziert die Pflanzensensitivität gegenüber Cytokinin [296, 199], ein Phytohormon, das unter anderem für die Entwicklung neuer Blätter zuständig ist. Daraus kann man schließen, dass die Konzentrationserhöhung des MYB50-Gens als Reaktion auf den Stress der Wachstumsverlangsamung dient. Die hier ausgeführten sowie weitere MYB-Faktoren weisen in dieser Arbeit zum ersten Mal eine stressspezifische Deregulation aufgrund des UV-Stresses auf. Auch Gene weiterer TF-Familien wurden hier identifiziert (z.B. AP2/EREP, WRKY, bHLH). Eine Vielzahl dieser Gene konnte hierbei zum ersten Mal mit der pflanzlichen Reaktion auf UV-Stress in Verbindung gebracht werden. Eine genaue Identifizierung der konkreten Funktion vieler dieser Gene war bisher noch nicht möglich. Die Ergebnisse in dieser Arbeit könnten jedoch zu deren Entschlüsselung beitragen.

Wie in Abbildung 3.36 führt der erhöhte UV-B-Anteil im Licht zu weitreichenden Störungen in der Photosynthese sowie zu weiteren Veränderungen in verschiedenen Prozessen des Energiemetabolismus. UV-Strahlung verursacht Veränderungen in der Elektronentransportkette des PS-II. Sie senkt die strukturelle Integrität des Thylakoids und des Chlorophylls und kann die Untereinheiten der Ribulose-1,5 Bisphosphatcarboxylase-Oxygenase beschädigen [284]. Während die Gene für die Elektronentransportkette (UCC2, NDB2, AOX1A) stärker exprimiert wurden, sinkt die Expression der Gene für den Energiemetabolismus als Reaktion darauf (Abb. 3.36). Die Gene für die Antennenproteine (LHC-Genfamilie) und PS-II (psa- und psb-Gene) wurden reprimiert. Das lässt sich durch die intensivere Expression der Gene der Elektronentransportkette wie z.B. RFNR1 (7.5, 3h) oder NDB2 (22.7, 3h) erklären. Die erhöhte Expression der ELIP1,2-Gene kann als weiterer Beweis dafür herangezogen werden, dass das UV-Licht einen zusätzlichen photooxidativen Stress in der Pflanze hervorruft. Die Regulation dieser Gene zeigt Ähnlichkeiten mit der pflanzlichen Reaktion auf Lichtstress. Weitere Gemeinsamkeiten weisen die stärker regulierten ELIP-Gene auf, die einen Schutz gegen photoinhibitorische Bedingungen darstellen [259].

Der verstärkte photooxidative Stress und die dadurch entstehenden Veränderungen in der Elektronentransportkette haben als weitere Konsequenz das Einsetzen der Seneszenz [250]. Wie in Abbildung 3.37 zu sehen ist, wird die Expression der Gene mit einer Funktion in der direkten Regulation der Seneszenz unter UV-Stress verstärkt. Interessanterweise reguliert die Einleitung der Seneszenz ver-

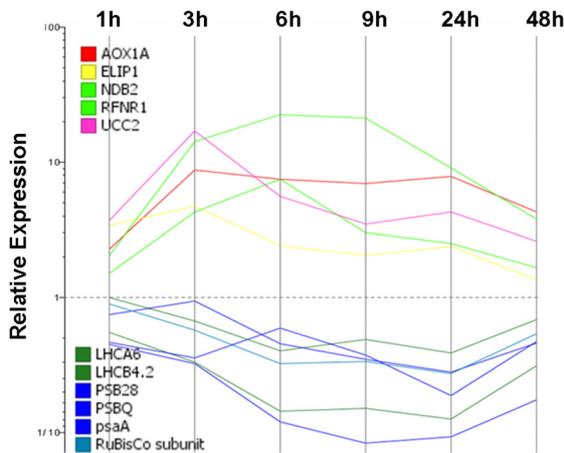


Abbildung 3.36: Genexpressionsverhalten im Energiemetabolismus

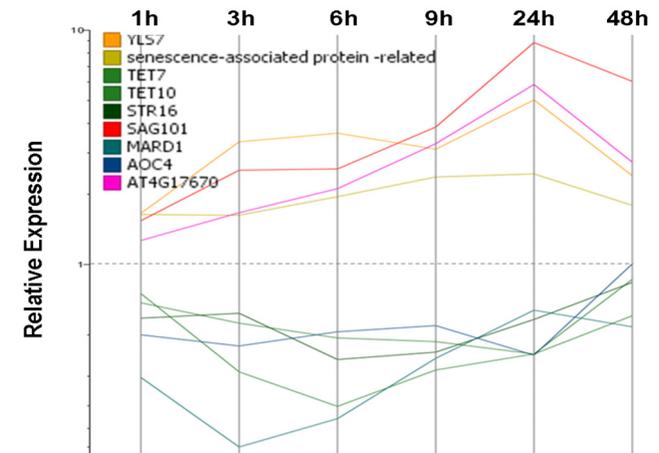


Abbildung 3.37: Die Expression der Seneszenzregulierenden Gene

UV-Stress ruft eine verstärkte Expression der Gene des Elektronentransportes hervor. Die Konzentration der Gene wird früh in der Stressphase (1-3h) erhöht und erreicht anschließend ein Gleichgewicht. Als Reaktion darauf werden Gene der strukturellen Integrität des Chlorophylls herabreguliert. In Abbildung 3.36 wird das Expressionsverhalten der Gene für die Antennepoteine und das Photosystem II exemplarisch dargestellt.

Gene mit einer direkten Funktion in der Einleitung des programmierten Zelltodes (YLS- und SAG-Gene) wurden unter UV-Bedingungen hoch exprimiert. Dagegen weisen Gene mit einer indirekten Rolle in der Seneszenz eine Herabregulierung auf. Gene wie Schwefeltransferase (Entwicklungsprozesse), Oxidcyclase (Hormonmetabolismus) oder weitere Gene der Sekundärmetabolismen werden als Reaktion auf den Stress bereits in der frühen Phase reprimiert.

schiedene pflanzliche Prozesse herab. Darunter befinden sich z.B Gene des Jasmonsäure-Signalweges (Hormonmetabolismus, AOC), Schwefeltransferasen (Energiemetabolismus, STR-Gene) oder verschiedene Transmembranproteine (TET Gene) [355].

Der Einfluss von UV-Stress auf den Auxinmetabolismus wurde bisher noch nicht vollständig untersucht. Die wenigen Experimente mit miRNA haben gezeigt, dass der Auxinsignalweg aufgrund der UV-Bestrahlung differentiell reguliert wurde [360]. In Abbildung 3.38 wurden einige Gene des Auxinsignalweges abgebildet. In der Untersuchung hat sich gezeigt, dass sowohl die durch Auxin regulierten Transkriptionsfaktoren (ARF- und AUX/IAA-Gene) als auch die Auxin regulierenden Gene (SAUR, AFB) herabreguliert wurden. Auxin funktioniert als Regulator für das Wachstum und die zelluläre Differenzierung. Die Reduktion der Gene in der Auxinsignaltransduktion erklärt die Verlangsamung des Wachstums aufgrund des Stresses. Eine Ausnahme in dieser Arbeit bildet die AIR-Genfamilie. Ein Zusammenhang zwischen dem Auxin und den ROS-Elementen als sekundären Signalmetaboliten wurde bereits früher vermutet [251, 86]. Die erhöhte Expression der AIR-Gene als Reaktion auf den UV-Stress in dieser Arbeit (Abb. 3.38) dient als eine weitere Unterstützung dieser Annahme.

Einen weiteren starken Effekt zeigen die Gene mit einer Rolle in der Regulation der Zellwandmodifizierungen. Die Enzyme für den Abbau der Zellwand wurden stärker exprimiert. Dagegen führte der Stress zur Expressionsreduktion solcher Gene, die für die Herstellung von Polysaccharide zuständig sind, aus denen die Zellwand besteht (Expansin, Arabinogalactan und Cellulose) (Abb. 3.39) [89].

Insgesamt ruft die Stressreaktion unter UV-Bedingungen bei der Pflanze eine intensive Reaktion hervor. Die Anzahl der signifikant differentiell regulierten Gene steigt kontinuierlich mit der Zeit (Abb. 3.11 auf Seite 45). Die Gesamtintensität dieser Gene verhält sich dagegen umgekehrt und sinkt mit der fortlaufenden Stressbehandlung (Abb. 4.2 auf Seite 105). Dieses Verhalten kann dadurch

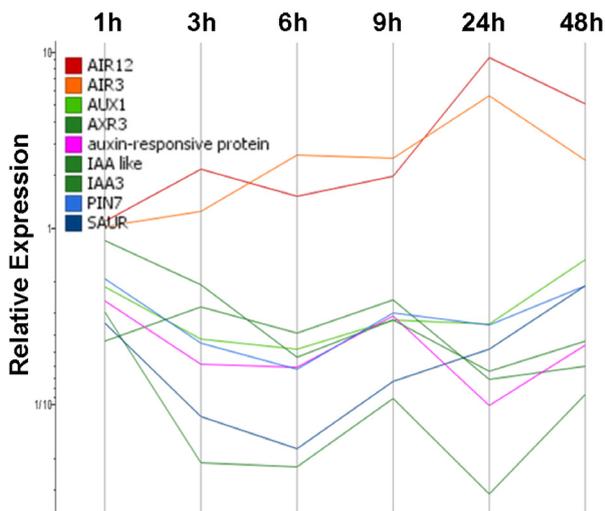


Abbildung 3.38: Gene des Auxinmetabolismus werden unter UV-Stress reprimiert.

Der Auxinmetabolismus wird als Reaktion auf den Stress verändert (Abb. 3.38). Transkriptionsfaktoren im Auxinsignalweg (AUX, IAA), Gene für Auxintransport (z.B. PIN7, SAUR) sowie die durch Auxin regulierenden Gene (AXR) wurden in der früheren Phase herabreguliert. Dagegen weisen die durch ROS-Elemente regulierenden Gene der AIR-Familie eine stärkere Aktivität, was auf einem Zusammenhang zwischen dem Auxin und den ROS-Elementen als Sekundärmetaboliten hindeutet.

Die strukturelle Integrität der Zellwand wird unter UV-Stress zerstört. Gene für die Bauelemente der Zellwand (Expansin, Pectin oder Arabinogalactan) wurden langsam aber kontinuierlich herabreguliert (Abb. 3.39). Die Repression dieser Gene geht mit einer stärkeren Expression solcher Gene einher, die für den Abbau der Zellwand zuständig sind, wie z.B. Pectinesterase). Die herabregulierten Gene zeigen eine erneute Intensitätserhöhung in den späteren Zeitpunkten. Der Grund für die erneute Erholung kann auf den transient angewandten Stress zurückgeführt werden.

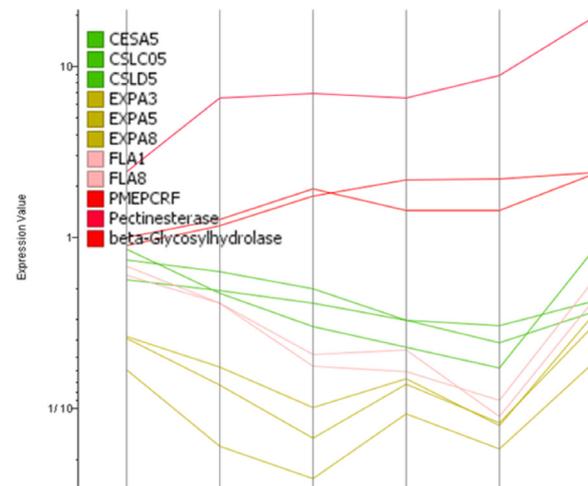


Abbildung 3.39: Zellwandmodifizierende Gene unter UV-Stressbedingungen.

erklärt werden, dass die Stressantwort mit einer niedrigeren Anzahl an regulatorischen Genen beginnt. Diese Gene wurden früh aktiviert und stark exprimiert. Im weiteren Verlauf regulieren sie eine wachsende Anzahl an Genen mit einer niedrigeren Expressionsintensität. Bei allen hier abgebildeten herabregulierten Genen wird eine zweite Aktivierungsphase in den späteren Zeitpunkten erkannt. Die Expression dieser Gene steigt langsam auf das Anfangsniveau. Dies geht mit dem Verhalten der Histon-Decetylasen (HDAC) bzw. -Acetyltransferasen einher. Die HDACs entfernen Acetylgruppen vom N-terminalen Histonende. Durch die Deacetylierung wird die Transkription herabreguliert. Die Acetylierung des Chromatins trägt zu dessen Lockerung bei, wodurch die Transkription begünstigt wird. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Gene für die Deacetylasen nach 48h herabreguliert wurden. Dagegen wurden Acetyltransferasen in dieselben Phase intensiver exprimiert. Das lässt darauf schließen, dass die Transkriptionsmaschinerie nach 48h erneut aktiviert wurde. Die Pflanze hat sich mittlerweile vom Stress erholt. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten ist der in dieser Arbeit verwendete transiente UV-Stress. Die Pflanzen wurden lediglich für 30 Minuten dem Stress ausgesetzt. Es lässt sich vermuten, dass die Akklimatisierungsphase bei der Pflanze nach einer gewissen Zeit einsetzt. Längere Stressperioden waren für die Pflanzen tödlich.

Aufgrund der unvollständigen Annotationen des *Arabidopsis*-Genoms ist es bisher nicht möglich, den kompletten Reaktionsverlauf auf der Genebene zu klären. Um das Verhalten der Pflanze unter Stressbedingungen besser zu verstehen und die hieraus resultierende Auffächerung der Reaktion zu erklären, wurde anschließend eine Analyse der funktionellen Annotationen durchgeführt.

Veränderungen im pflanzlichen Metabolom aufgrund des UV-Stresses UV-Stress führt zu einer

Veränderung mehrerer metabolischer Prozesse und in der Struktur unterschiedlicher Organellen. In Tabelle 3.26 wurden die Veränderungen sowohl im metabolischen Haushalt der Pflanze als auch in der strukturellen Integrität der Zelle dargestellt. Die Gene der metabolischen Signalwege als Antwort auf den biotischen Stress (Elicitoren, Pilzinfektion, Jasmonsäure) sowie die hormonelle Antwort (ABA, Cytokinine, Ethylen) wurden konstant hoch exprimiert. Prozesse der Protein-, DNA- und RNA-Modifizierungen wurden intensiver betrieben. Mehrere Transkriptionsfaktoren wurden hochreguliert, um die immensen Veränderungen in den verschiedenen Signalprozessen zu regulieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die sekundärmetabolischen Prozesse stark vom Stress reprimiert wurden. Energieprozesse sowie Kohlenhydratmetabolismen wurden herabreguliert. Die Prozesse zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität wurden ebenfalls reprimiert.

Die schädliche UV-Strahlung ruft starke Veränderungen in pflanzlichen metabolischen Prozessen hervor, die Ähnlichkeit mit der Reaktion auf einen Angriff durch pathogene Erreger haben. Dies lässt das überrepräsentative Auftreten metabolischer Prozesse im Zusammenhang zu einer biotischen Stressantwort erklären [183]. Das bakterielle Protein Harpin bindet an die zelluläre Membran und aktiviert über eine MAP-Kinase pflanzliche Abwehrmechanismen [185]. Methyljasmonat beteiligt sich an mehreren Entwicklungsprozessen sowie an der Seneszenz [281]. Die Elicitoren sowie die UV-Strahlung induzieren die Produktion von ROS-Elementen. Die Pflanze macht sich deren Funktion als Signalmoleküle zunutze. Diese dienen als Signalelemente, um z.B. den programmierten Zelltod einzuleiten. Die Reaktion der Pflanze auf Verwundungsstress ähnelt ebenfalls der Reaktion auf UV. Verschiedene MAP-Kinasen mit einer Funktion in der Antwort auf Verwundung wurden in dieser Arbeit differentiell reguliert. Die Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren wurde über ihre W-Box bei all diesen Faktoren induziert. Sie regulieren mehrere Prozesse von der Entwicklung und dem Wachstum bis hin zum Proteinabbau und dem programmierten Zelltod (PCD). Dieses Verhalten erklärt die erhöhte Aktivität in den Gruppen der Abbauprozesse und der Autophagie. Proteinabbau ist einer der ersten Schritte beim PCD. Eine erhöhte Aktivität von Ubiquitin und Proteosomen sowie verschiedener Proteasen sind häufig ein Zeichen für die Einleitung des PCD.

Interessant ist die Akkumulation von Genen für Proteine mit einem VQ-Motiv bzw. Ankyrin in den früheren Messungseinheiten. Die Funktion der VQ-Proteingruppe konnte bisher noch nicht explizit bestimmt werden. Es wird vermutet, dass sie an Prozessen der Transkriptionsinitiation teilnehmen. Ankyrine sind bekannte Bindungsproteine, welche die Verteilung von Membranproteinen mitbestimmen können. VQ-Motive wurden in vielen unterschiedlichen Proteinen gefunden. Sie weisen verschiedene Längen und Strukturen auf, besitzen aber alle eine bestimmte Sequenz (FXhVQChTG, [74]). Um die genaue Rolle der VQ-Gene unter UV-Stress bestimmen zu können, sind weitere Experimente nötig. Die Tatsache, dass diese Gene am Anfang der Stressbehandlung aktiv wurden, deutet darauf hin, dass sie eine mögliche Rolle bei der Regulation der Stressantwort unter UV-Strahlung spielen. Die Gruppe der VQ-Proteine beinhaltet unter anderem verschiedene MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren (ARR-Gene), deren Funktion noch nicht geklärt ist, die jedoch für ihre regulatorische Rolle bekannt sind. Diese Gruppe könnte das Verbindungsstück zwischen der äußeren Stressquelle und den inneren Schutzmechanismen zur Regulation der Stressantwort darstellen.

Phytohormone beteiligen sich an mehreren Wachstums- und Entwicklungsprozessen in der Pflanze. Während Abscisinsäure (ABA) und Ethylen als hemmende Hormone gelten, fördert Auxin das Wachstum. Unter UV-Stress gerät der Hormonhaushalt aus dem Gleichgewicht. In einer der ersten Reaktionen der Pflanze auf den neuen Stress wird die Ethylensynthese und -konzentration erhöht [254]. Ethylen fungiert unter anderem als Regulator anderer Phytohormone wie z.B. Abscisinsäure. ABA spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Pflanze auf UV-Stress. Die Regulation der

GO-Level	Biologische Funktion	Gengruppen	1h	3h	6h	9h	24h	48h	Quelle	
Reaktion auf biotischen Stress	Antwort auf Elicitor	Harpin Z	+	+	+	+	+	+	1	
		MeJa	+	+	+	+	+	+	1	
		GST	+	+	+	+	+	+	1,2	
	Pathogenangriff	Chitin	+	+	+	+	+	+	1,2	
		Reaktion auf Pilzinfektion	+	+	+	+	+	+	2	
		Abwehrreaktion	+	+	+	+	+	+	2,3,4	
Immunantwort	Verwundungsstress							1,2,4		
	Antwort auf Stress	externer Stress	+	+	+	+	+	+	2,5	
Hormonreaktion	ABA	Reaktion auf ABA	+	+	+	+	+		1,3,5,6	
	Cytokinin	Glycosidbiosynthese		+					3,6	
	Auxin	SAUR-Proeine				+	+		1,2,5,6	
	Ethylene		+	+	+	+			3	
Transkription	Transkriptionsfaktoren	AP2/EREB Gene	+	+	+	+	+	+	3,4,6	
		WRKY-Familie	+	+	+	+	+	+	1,3,4,6	
		NAC-, NAM-Familie	+	+	+	+	+	+	3,4,6	
		HSF-Gene	+			+			2,4,6	
		bHLH-Faktoren		+				+	2	
Protein-modifizierung	Abbauprozesse	Ubiquitin, Proteosom, Autophagie			+	+	+	+	1,2,3,5	
	Proteinbindung	VQ-Motiv	+	+	+				2,3,4	
Signalingsprozesse	Kinasen (ST,TK)	Ankyrin	+	+					2,4	
		LRR-Proteine	+		+	+	+	+	2,3,4	
		Calciumsignaling	Calmodulin (Ef-Hand)	+	+	+	+	+	+	3,4
		Hormon-bedingte Reaktion	Ethylene, Auxin	+	+	+	+	+	+	2,3
Transport	Exozytose	Vesikeltransport			+	+	+	+	2,3,4	
	Protonentransport		+						3	
Entwicklung	Zellwachstum	multidimensionales Wachstum		+	+				3	
	Zelltod	PCD	+	+			+	+	1,2,4	
	Cuticula	Struktur	+						2	
zelluläre Prozesse	Coenzymbindung	Epimerase					+			
	Peroxidaseaktivität	Peptidase			+	+			2	
	Motoraktivität	Kinesin, Dynein		+	+	+	+	+	2,4	
	Microtubuli			+	+	+	+	+	2,4	
Zellstrukturen	Cytoskeleton	Expansin, Pectin	+	+	+	+	+	+	1,2,4	
	Membranstruktur	intrinsische TM-Proteine	+						2	
	Zellwand	Pectin, Lyase	+	+	+	+	+	+	1,2	
	Proteosomkomplex	Ubiquitin, Proteasen	+	+	+	+	+	+	2,4,5	
	Chromatinstruktur	Chromosome	+	+					2	
	Nucleosome	Histone, Chromatin	+	+		+	+		1,2,4	
	Plastid, Chloroplast	Thylakoid	+	+	+	+	+	+	1,2	
Energiemetabolismus	Photosystem I / II	PS-, LHC-Proteine	+		+	+	+	+	2	
	Chlorophyllbiosynthese		+		+	+	+	+	2,5	
	Photosynthese, Lichtreaktion		+		+	+	+	+	2,5	
	Phototropismus	NPH3		+			+	+	4	
	Stickstoffmetabolismus	Glycine, A(M/T)P		+			+		2	
Aminosäure-metabolismus	Methanmetabolismus							+	2	
	aromatische Verbindungen		+		+		+	+	2	
Lipidmetabolismus	Phenylpropanoidbiosynthese	Flavonoide, Lignine	+		+		+	+	2,5	
	Carotenoide							+		
	Lipase	Carboxyltransf., Acetyltransf., -synthase	+	+	+	+	+		3,4	
Kohlenhydrat-metabolismus	Steroide	Biosynthese	+						2,4	
	Polyketide, Fettsäuren	Wachsbiosynthese	+	+	+	+	+		2,4	
	Lectin	Jacalindomäne	+						4	
	UDP-glycosyltransferase Aktivität			+					4	
	Stärke	Abbau			+	+	+	+	2	
Kohlenhydrat-metabolismus	Metabolismus				+	+	+	+	2	
	Polysaccharidmetabolismus					+	+	+	2	
	Kohlenhydratbindungen	β -galactosidase			+	+	+	+	2,3,4	

Tabelle 3.26: Veränderungen der metabolischen Prozesse unter UV-Stress. UV-Licht ausgesetzte Pflanzen weisen verschiedene Veränderungen im metabolischen Haushalt auf. Mehrere Prozesse zum Schutz der Pflanze vor dem Stress wurden aktiviert (Produktion der ROS-Elemente, Abwehrmechanismen, WRKY-Transkriptionsfaktoren usw.). Abbauprozesse und deren Elemente treten verstärkt auf (Ubiquitine, Proteasen). Auf der anderen Seite wurden mehrere metabolische Prozesse reprimiert. Die Energie- und Kohlenhydratmetabolismen wurden verlangsamt, Prozesse des Zellwachstums und der zellulären Entwicklung wurden reduziert.

1-frühere Experimente; 2- GO Annotationen; 3- Mapman; 4-Pfam; 5-KEGG; 6-DATF (Information über bekannte Stoffwechselwege)

Seneszenz und die Stressanpassung sind zwei solche Funktionen. Die Konzentrationserhöhung von ABA und des Ethylen in der Zelle führt zur Wachstumsverzögerung und einer verbesserten Stresstoleranz [93, 254]. Nicht viel ist bisher über den Einfluss von UV-Licht auf das Verhalten der Auxin-Gene bekannt [144]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit liefern eine mögliche Erklärung für das Verhalten der Auxin-Gruppen. Wie aus Tabelle 3.26 ersichtlich ist, wurde der Auxinmetabolismus reprimiert. Auxin ist für das Wachstum und die Meristembildung zuständig. Aufgrund der Herabregulierung des Auxinmetabolismus wurden diese Prozesse verlangsamt und das Wachstum gehemmt.

Während der Phenylpropanoidsignalweg unter Hitzebedingungen reprimiert wird, weist er hierähnlich wie bei Trockenstress (Seite 74)- eine erhöhte Aktivität auf. Diese sekundären Pflanzenstoffe werden von der Pflanze als Schutz gegen UV-Stress verwendet [201]. Die Biosynthese der Phenylalaninderivate aus dem aromatischen C₆-Ring findet früh im Stressverlauf statt. Die Bildung der unterschiedlichen Produkte ist sowohl einem zeitlichen als auch einem räumlichen Muster unterlegen.

Die Flavonoide befinden sich in den Vakuolen der Epidermis und bewirken einen UV-Schutz des darunterliegenden Gewebes. Sie absorbieren UV-Strahlen und verhindern so die Schäden an der zellulären DNA. Die Lignine sind dagegen Heteropolymere, die zur Dichtung und Festigung der Zellwand beitragen. Die Bildung von Lignin ist vom Entwicklungsstadium abhängig und wird von Umweltfaktoren wie Licht oder Temperatur beeinflusst [127]. Über den Einfluss des UV-Stresses auf Ligninaufbau und -struktur ist bisher nicht viel bekannt. Die Verholzung der Zellwand wird von der Pflanze als eines der Mechanismen zum Schutz der Zelle vor äußeren Reizen verwendet (z.B. Pathogenangriff, Verwundung oder auch abiotischer Stress). Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestärken die Annahme, dass UV-Stress die Verholzung (Lignification) der Zelle befördert. Die Akkumulation der Ligninmoleküle ist nötig, um die durch den Stress expandierenden Epidermalzellen zu stabilisieren [351]. Um Information über die genauen Abläufe des Phenylpropanoidsignalweges und die daraus hervorgehenden Veränderungen in den pflanzlichen Metabolismen müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Ähnlich wie bei der Reaktion auf Hitzestress weisen die sekundärmetabolischen Prozesse eine herabregulierende Tendenz auf. Energie-, sowie Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus wurden als Reaktion auf den Stress reprimiert. Das Photosystem II wurde unter UV-Stress sehr schnell angegriffen. Das Reaktionszentrum des Systems mit den D1- und D2-Proteinen wurde degradiert [34]. Frühere Experimente haben den Einfluss von UV-Stress auf PS-II bereits identifiziert [134]. In dieser Arbeit wurden die Schäden im Photosystem-I nachgewiesen. Nicht nur die photosynthetische Maschinerie, sondern die komplette Chlorophyllbiosynthese wurden herabreguliert oder beschädigt. Ein möglicher Grund für die Reduktion der Aktivität des Energiemetabolismus liegt in der erhöhten Aktivität der ROS-Elemente. Diese werden unter UV-Stress als Signalmoleküle für verschiedene Prozesse verwendet (unter anderem für die Regulation von Zellteilungen und die Einleitung des programmierten Zelltodes).

Die Schäden in der Struktur und Funktion der Plastiden haben weitreichende Einflüsse auf weitere metabolische Funktionen. Langkettige Fettsäuren werden hauptsächlich in den Plastiden hergestellt. Das hat zur Folge, dass deren Biosynthese aufgrund des Stresses reprimiert wurde. Der Lipidmetabolismus und die Lipaseaktivität wurden direkt nach Stressbeginn deutlich reduziert. Diese Reduktion bedeutet für die Pflanzen weniger Energie (Lipasen sind an der Hydrolyse von Triglycerinen beteiligt). Die Lipidperoxidation wurde durch die Erhöhung der zellulären ROS-Anteile begünstigt. Ein langanhaltender Stress führte zum starken Abbau der Lipide. Infolgedessen wurden Schäden in der strukturellen Integrität der Zellmembran und Zellwand hervorgerufen.

Die Prozesse der Kohlenhydratmetabolismen wurden als Reaktion auf den Stress ebenfalls re-

primiert. Die Regulation der Kohlenhydratbiosynthese ist von vielen weiteren Prozessen abhängig. ROS-Elemente, ABA oder Auxine in der Zelle sind nur einige der Metaboliten, die einen Einfluss auf die Biosynthese verschiedener Kohlenhydrate ausüben. Ob ein direkter Einfluss des UV-Lichtes auf Kohlenhydrate existiert, ist bisher experimentell nicht eindeutig identifiziert worden. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Aktivität in unterschiedlichen Kohlenhydratmetabolismen, wie z.B. die der UDP-Glycosyltransferase, dem Stärkemetabolismus und der anderen Polysaccharidbiosynthesen in der späteren Phase des UV-Stresses reduziert wurde. Ein interessantes und etwas unerwartetes Ergebnis ist die Herabregulierung der UDPG-Prozesse. Die UDP-Glycosyltransferasen beteiligen sich an der Synthese von Anthocyanen. Sie dienen dem Schutz der Pflanze vor der UV-Strahlung. Aus diesem Grund scheint es etwas ungewöhnlich, dass diese Gengruppe unter UV-Stressbedingungen herabreguliert wird. Ein möglicher Grund ist der Versuch der Pflanze, Energie zu sparen. Es wäre auch möglich, dass die Reduktion der Syntheserate von UDPG-Molekülen einem anderem, bisher unbekanntem Grund, dienen soll. Hier wurden Stärkemoleküle aufgrund des Stresses abgebaut. Dieses kann dadurch erklärt werden, dass die Pflanze wegen der Herabregulierung der Energiemetabolismen nicht genug Energie produziert. Sie greift deshalb auf die in den Stärkemolekülen gespeicherten Energiereserven zurück. Dies kann die Pflanze nur über einen begrenzten Zeitraum durchhalten, bevor auch diese Vorräte aufgebraucht sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können die Induktion verschiedener Prozesse auf den Stressbeginn bzw. dauerhafte Stressbehandlung wiedergeben. Eine bestimmte Reaktionsreihenfolge kann dadurch bisher jedoch nicht genau bestimmt werden. Um festzustellen, ob z.B. die instabile Zellintegrität durch die Lipidperoxidation verursacht wurde, oder durch die Reduktion der Genexpression für die Zellmembranproteine (Pectin, Expansin usw.) hervorgerufen wird, sind weitere Experimente erforderlich.

Analyse der zeitabhängigen differentiellen Regulation unter UV-Stress. Die Gesamtintensität der durch UV-Licht deregulierten Gene sinkt in Zeitverlauf (Abb. 4.2). Unabhängig vom Expressionsverhalten wurden in fast allen Kategorien Gene der Abwehr- und biotischen Stressreaktion differentiell reguliert (Tab. 3.27). Als erste Reaktion auf den Stress wurden Gene der Abwehrreaktion hoch reguliert. Cluster 1, 2 und 3 in Abb. 3.27 beinhalten Gene, deren Expression bereits nach einer Stunde hoch reguliert wurde. Cluster 4, 5 und 6 weisen Gene der biotischen Stressantwort auf. Die Expression dieser Gene steigt kontinuierlich mit der Zeit. Sie erreicht ein Maximum nach 3h bzw. 24h, was auf einen circadianischen Zyklus in der Stressreaktion hindeutet. In den letzten zwei Clustern wurden jedoch auch Gene aus verschiedenen sekundärmetabolischen Signalübertragungswegen identifiziert. Diese Gengruppen zeigen eine kurzzeitig erhöhte Expression in den ersten zwei Messungseinheiten. Gene mit einer Funktion in der Reaktion auf die biotische Stressantwort und Stressabwehr sind für diese Intensitätserhöhung verantwortlich. Anschließend sinkt die Expression wieder. In dieser Phase überwiegt die Expressionsverminderung der Gene für die sekundärmetabolischen Prozesse. Gene der Energie- oder Hormonmetabolismen, sowie solche für die Bildung von Sekundärmetaboliten, weisen ein Expressionsmaximum nach 3h bzw. 6h auf. Anschließend wird die Expression dieser Gene reprimiert. Es kommen hier mehrere Gene vor, deren Funktion noch nicht bestimmt werden konnte. Mit diesen Resultaten wurde es zum ersten Mal möglich, diesen Genen eine regulatorische Funktion in den sekundärmetabolischen Prozessen zuzuordnen.

Die Analyse der Veränderungen im Expressionsverlauf weist auf ein zweiphasiges Expressionsverhalten hin (Tab. 3.28, [294]). Die überwiegende Antwort der Gene mit einer Funktion in der Reaktion auf externe Stressfaktoren (Pilz- und bakterielle Stressreaktion) wurde in beiden Phasen sichtbar.

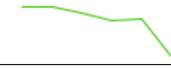
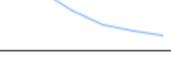
Cluster-Nr.	Anzahl	Expressionsverlauf	biologische Funktionen
1	50		Abwehrreaktion
2	27		Abwehrreaktion, SA-, JA-Signalweg, SAR
3	76		Abwehrreaktion, Chitinabwehr, Reaktion auf Temperaturstimulus
4	161		Reaktion auf biotischen Stress (SA, Camalexin, Chitin), toxische Stressantwort
5	50		Reaktion auf toxischen Stress
6	86		biotische Stressantwort, SAR, HR, Zellwandabbau
7	97		AA Biosynthese, JA-Synthese, Oxylinreaktion, Immunabwehr
8	158		AA Biosynthese, Auxin-, IAA- Biosynthese, Nukleotidmetabolismus, Sekundärmetabolismen

Tabelle 3.27: Die transiente Expression der differentiell regulierten Gene unter UV-Stress. Transient exprimierte Gene unter UV-Licht weisen eine starke Überrepräsentation der Gene mit einer Funktion in der Reaktion auf biotischen Stress auf. In allen Clustern überwiegt die Anzahl der Gene mit einer Funktion in der Reaktion auf toxischen Stress, SAR und HR sowie Gene der Salicyl- und Jasmonsäuresignalwege. Cluster 7 und 8 zeigen eine schnelle, kurzfristige Akkumulation der Sekundärmetabolismen-relevanten Gene. Diese Gene wurden in den späteren Phasen des UV-Stresses herabreguliert.

Die Akkumulation der Gene für die Sekundärmetabolismen zeigt einen großen Anstieg in der ersten Phase, während in der zweiten viele Gene der abiotischen Stressantwort herabreguliert wurden.

Die hier verwendeten Algorithmen der Zeitreihenanalyse [224, 319, 294, 293] lieferten ein eindeutiges Ergebnis zum Expressionsverhalten der Pflanzen als Reaktion auf UV-Stress. Die Pflanze erkennt den Bestrahlungsstress als einen äußeren Reiz und aktiviert mehrere Prozesse der SAR- (Systemic Acquired Resistance) und HR-Signalwege (Hypersensitivity Reaction) [292, 118]. Dies geht mit der Expressionserhöhung der Gene für JA und SA einher (Jasmonic bzw. Salicyl Acid). [45, 84]. Die deregulierte Expression dieser Gengruppen findet in zwei Phasen statt. Nach 1h und nach 9h wurde eine signifikante Deregulation identifiziert. Aufgrund der transienten Stressperiode deutet dieses Verhalten auf eine schnelle Stressantwort in der ersten und den Beginn des Erholungsprozesses in der zweiten Phase zurückführen. Während in der ersten Phase viele sekundärmetabolischen Prozesse dereguliert wurden, zeigt sich keine Veränderungen in der Expression der Gene für die abiotische Stressantwort. Erst in der späteren Stressreaktion wird die Akkumulation dieser Gengruppen signifikant. Der Weg, über den das Signal erkannt und die Stressantwort eingeleitet wird, konnte bisher nicht geklärt werden. Der Anstieg der Gene für die Produktion der ROS-Elemente in den ersten Stunden deutet jedoch auf eine mögliche Rolle dieser Elemente als Stresssensor hin.

Die Analyse der UV-deregulierten Transkriptionsfaktorbindestellen. Bei der Analyse der differentiellen Expression der überrepräsentativen Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS) wurden zwei Motive gefunden, die einzig unter UV-Stress akkumuliert wurden (Tab. 3.29). Das erste Motiv wurde in der Tabak-Pflanze identifiziert (NtRSG_AT, Sequenz TCCAGCTTGA) [132]. Dort wurde dieses Motiv der Familie der bZIP-TF zugeordnet. Eine wahrscheinliche Rolle ist dessen Beteiligung in pflanzlichen Entwicklungsprozessen. Eine Verbindung zwischen dem UV-Licht und diesem Motiv ist bisher noch nicht bekannt. Dieses Motiv kommt lediglich in 18 Genen des *Arabidopsis*-Genoms vor. Sechs dieser Gene wurden unter UV-Stress hochreguliert. Diesen Genen wurde bisher keine be-

Funktion	3h - 1h	6h - 3h	9h - 6h	24h - 9h	48h - 24h
Reaktion auf Reize	1.71E-13			2.82E-14	
Reaktion auf biotischen Stress	1.24E-7	8.39E-4		4.26E-12	
Reaktion auf abiotischen Stress				2.52E-6	
Reaktion auf chemischen Stress	8.87E-12			2.28E-5	
Abwehrreaktion	2.32E-5	1.97E-4		8.06E-7	
Bakterien-/Pilzabwehr	7.13E-8	6.36E-4		3.11E-8	
Pathogenese				4.28E-6	
Toxinstress	6.27E-6				
SA-Metabolismen	8.21E-4			2.70E-5	
JA-Stressantwort				5.89E-7	
Reaktion auf Hormonstress	5.68E-5				
Ethylensignalwege	8.27E-7				
Sekundärmetabolismen	6.04E-9			5.49E-4	
Phenylpropanoidbiosynthese	5.22E-6			7.14E-4	
Ligninbiosynthese	1.99E-4				
aromatische AA-Biosynthese	5.64E-9				
Camelaxinbiosynthese	1.81E-5				
Zellwand katabolische Prozesse	9.75E-4				
Indolebiosynthese	8.81E-5				
Tryptophanbiosynthese	8.82E-6				
Glucanmetabolismus					2.24E-4
Lipidtransport					7.36E-5
Zelladhäsion					3.08E-4
Hitzestressantwort	7.87E-5	3.70E-4			
Trockenstressantwort		3.93E-4			
Lichtstress				2.04E-4	
Oxidativer Stress				4.84E-4	
UV-Stress				2.56E-4	
ROS-Antwort				3.63E-4	
Anthocyanmetabolismus				6.92E-5	

Tabelle 3.28: Deregulationsveränderungen in der Genexpression der unter UV-Stress exprimierten Gene. Die Analyse der Veränderungen im Expressionsverlauf deutet auf eine Stressantwort in zwei Phasen hin. Sowohl in der ersten (nach 3h) als auch in der zweiten Phase (zwischen 9h und 24h) überwiegen die Gene der biotischen Stressantwort. In der ersten Phase wurden Gene der Sekundärmetabolismen differentiell reguliert. Gene aus den funktionellen Gruppen der Hormon-, Energie- und Aminosäuremetabolismen sowie die Gene für die strukturelle Integrität zeigen in dieser Phase eine differentielle Expression. Die Gene der abiotischen Stressantwort weisen keine differentielle Regulation über die Zeit in der ersten Phase auf. Sie wurden vom Stressbeginn an stark exprimiert. Im nächsten Schritt wurden diese Gene herabreguliert.

kannte Funktion zugeordnet. Eine mögliche Funktion hängt mit dem konservierten Lysin zusammen, das die Aminosäure Arginin innerhalb der Bindedomäne ersetzt. Lysine spielen eine Rolle bei der Regulation der Transkription durch Acetyltransferasen-Deacetylasen. Die Veränderung der Lysinladung dereguliert die Transkriptionsmaschinerie. Die Deregulation dieser Gene geht vermutlich mit der differentiellen Expression der Histonstruktur-regulierenden Gene einher.

Das zweite Motiv, SREATMSD (Sequenz TTATCC) wurde als Zucker-reprimierendes Element (SRE) identifiziert [308]. Herabregulierende Gene mit diesem Motiv wurden bei Pflanzen nach einer Dekapitation der Sprossachse akkumuliert. Das deutet auf eine Rolle dieser Gene in der Wachstumsregulation hin. In der Kategorie der durch UV-Stress differentiell regulierten Gene wurden in dieser Arbeit mehrere Gene des Energiemetabolismus identifiziert. Gene mit einer Funktion in der Erstellung der Lichtsammelkomplexe (LHCs) und Photosystemproteine (Psas und Psbs) wurden unter UV-Bedingungen herabreguliert [323]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gene der Kohlenhydratmetabolismen differentiell reguliert werden. Trotz der Erwartungen für die Herabregulierung der Gene mit diesem Motiv unter UV-Licht weisen sie in dieser Arbeit eine verstärkte Expressionsintensität auf. Gene aus der Glykolyse (Epimerasen, Aldolasen) sowie Gene des TCA-Zyklus (Succinyl-CoAs) und des Pentosephosphatweges wurden intensiver exprimiert. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg in der Expressionsintensität könnten weitere bisher unbekannt Funktionen dieser Gene in der Regulation der Pflanze mit einer ansteigenden zellulären ROS-Konzentration sein.

Bindestelle	Stress	Sequenz	01h	03h	06h	09h	24h	48h
ABRELATERD1	Allgemein	ACGTG						
ABRE-like binding site motif	Allgemein	AACGTG[GT][AC]						
ABRERATCAL	Allgemein	[AC]ACG[CT]GA						
CACGTGMOTIF	Allgemein	CACGTG						
ACGTABREMOTIFA2OSEM	Allgemein	ACGTGKC						
ACGTATERD1	Allgemein	ACGT						
GADOWNAT	Allgemein	ACGTGTC						
SREATMSD	UV	TTATCC						
NrRSG_AT	UV	TCCAGCTTGA						
CGCGBOXAT	oxidativer Stress	TCGCGA						
ANAEROICONSENSUS		AAACAAA						
TBOXATGAPB		ACTTTG						
TRAB1		CGCGTG						
ASF1MOTIFCAMV		TGACG						
Bellringer/replumless/pennywise BS1 IN AG		AAATTAATAA						

Tabelle 3.29: Transkriptionsfaktorbindestellen unter UV-Stressbedingungen. Die durch ABA-TFBS regulierte allgemeine Stressreaktion wird unter UV-Licht im mittleren Bereich überrepräsentiert. 6h bzw. 9h nach Stressbeginn wurden die ABA-abhängigen TFBS überdurchschnittlich in der Anreicherungsanalyse gefunden. Die Reaktion der oxidativen Stressgruppen (d.h. diese Gruppen kommen unter UV-Stress und Paraquatbehandlung vor) erscheint direkt mit dem Stressbeginn und klingt in der zweiten Phase ab. Dagegen wurden die stressspezifischen TFBS erst in der zweiten Phase identifiziert, was auf deren Rolle in der Stresserholung bzw. in der Toleranzentwicklung schließen lässt.

Die Identifizierung dieses signifikanten Verhaltens bei vielen Genen, die lediglich unter UV-Stress und bei den mit Paraquat behandelten Pflanzen differentiell reguliert wurden, verstärkt diese Annahme. Weitere überrepräsentative Funktionen in der Gruppe der unter UV-Stress deregulierten Gene mit diesem Motiv wurden gefunden. Zu dieser Gruppe gehören Gene der Proteinmodifikation (Abbau, Faltung). Die differentielle Expression solcher Gene wurde beim UV-Stress erwartet, wobei die Pflanze sich gegen den Stress zu schützen versucht. Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten auf eine neue mögliche Funktion der Gene mit einem SRE-Motiv hin.

In der Analyse der überrepräsentativen TFBS wurden weitere Motive in der Gruppe der allgemeinen Stressantwort mit einer Verbindung zu ABA- hauptsächlich im mittleren Messbereich- gefunden. Die Signalwege der UV-Stressantwort konnten bisher nicht vollständig geklärt werden [254]. ABA dient als einer der sekundären Metaboliten in der Regulation der Schutzmechanismen gegen den Stress. Die Motive der ABA-relevanten Gene wurden hauptsächlich in den Zeitmessungen 3h und 6h gefunden. Ein möglicher Grund für die erhöhte Anzahl der Gene mit einer ABA-Abhängigkeit ist die Veränderung in der Wachstumsregulation aufgrund des Stresses. Ein weiterer Grund ist die Beteiligung von ABA an der Stressregulation von Sekundärmetaboliten.

Die Suche nach weiteren angereicherten Sequenzen in der UV-deregulierenden Gengruppe lieferte weitere Motive. In den früheren Messungspunkten wurde das Motiv CGCGBOXAT (Sequenz GCCGCGGC) mit einer möglichen Funktion in der Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung gefunden. Ca^{2+} und Calmodulin sind für ihre Funktion als Signalmoleküle bekannt. Die erhöhte Expression in den früheren Phase deutet darauf hin, dass sie unter UV-Bedingungen möglicherweise als eines der Sensoren bei der Stressdetektion dienen.

Die Reaktion der Pflanze auf UV-Stress zeigt in dieser Arbeit nach Hitzestress die zweitgrößte Anzahl an differentiell regulierten Genen (Abb. 3.11). Die relative Intensität war bereits nach 1h sehr hoch (Abb. 4.2). Das deutet auf eine niedrige Anzahl von stark differentiell regulierten Genen hin. Während diese Anzahl steigt, sinkt die relative Intensität. Daraus kann vermutet werden, dass die Antwort auf UV-Stress mit einer niedrigeren Anzahl an stressspezifischen Genen beginnt. Diese Gene wiederum regulieren eine wachsende Anzahl weiterer metabolischer Prozesse.

Durch verschiedene Analysen wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass mögliche Stresssensoren (ROS-Elemente, Ca^{2+} /Calmodulin) sowie Gene zum Schutz der Pflanze vor dem Stress bereits in der frühen Stressphase hoch reguliert wurden. Die Expression dieser Gengruppen geht im Verlauf des Stressaussetzens nicht zurück. Dafür kommen weitere sekundärmetabolische Prozesse sowie Gene der strukturellen Integrität hinzu. Die Analyse der TFBS konnte wenige spezifischen Motive identifizieren. Der Zusammenhang zwischen diesen Motiven und dem UV-Stress kann bisher nur vermutet werden. Beide Motivgruppen beinhalten Gene der RNA- bzw. Proteinregulationsprozesse. Daraus lässt sich eine neue Funktion für die Gene mit diesem Motiv in der Modifikation der Transkriptions- bzw. Translationsmaschinerie postulieren.

Am Stressanfang wurden mehrere Transkriptionsfaktoren differentiell reguliert. Zum Teil wurde sogar ein stressspezifisches Verhalten festgestellt. Für viele TFs aus dieser Liste wurden hier zum ersten Mal einer Funktion in der Antwort auf UV-Stress nachgewiesen. Die große Anzahl an verschiedenen TF verdeutlicht die Komplexität der Stressantwort. Um die genauen Mechanismen besser verstehen zu können, müssen die von diesen TF stromabwärts regulierten Gene identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde die experimentelle Analyse mehrerer abiotischer Stressfaktoren durchgeführt. Die Rohdaten aller Experimente sind Eigentum der Bayer CropScience AG und wurden deshalb nicht veröffentlicht. Für die ausführlichere Analyse erfolgte eine Konzentration auf drei Stressfaktoren (Hitze, Trockenheit, UV-Licht). Dies wurde aus zwei Gründen entschieden. Die Analyse aller sieben Stressfaktoren würde den Rahmen einer Promotionarbeit sprengen. Aus diesem Grund fokuzierte sich diese Arbeit auf die Stressfaktoren, die für die Agrarwirtschaft eine bedeutendere Rolle spielen. Aufgrund der veränderten klimatischen Bedingungen werden Nutzpflanzen mehr und mehr dem Stress wie Hitze, Trockenheit (Wassermangel) oder UV-Licht (das Verschwinden der Ozonschicht) ausgesetzt. Die Analysen dieser drei Stressfaktoren zeigen ein außergewöhnliches Expressionsverhalten. Hitzestress weist eine kontinuierlich hohe Anzahl differentiell regulierter Gene auf. Die trockenheitsbedingte Stressantwort zeigte zwar eine niedrige Anzahl deregulierter Gene, dafür wurden diese aber sehr intensiv exprimiert. UV-Stress wurde als einziger Stressfaktor transient angesetzt (kontinuierlicher Stress konnte nicht verwendet werden). Obwohl der Stress lediglich 30 Minuten dauerte, wurde bis 9h nach Stressbeginn die Anzahl der deregulierten Gene immer größer. Erst nach 24h konnte eine relative Erholung der Pflanze beobachtet werden.

Die Analyse der restlichen vier Stressfaktoren, Kälte, Salz-, Licht- und chemischen Stress zeigte ein relativ mildes Expressionsverhalten. Die Intensität der Gene bleibt niedrig (Abb. 4.2). Die Anzahl der deregulierten Gene unter Kälte wächst zwar kontinuierlich, die anderen drei Faktoren weisen im Durchschnitt eine ähnliche Anzahl an veränderten Genen auf. Um die Antwort der Pflanze auf abiotischen Stress verstehen zu können, wäre die Vervollständigung dieser Analyse sehr sinnvoll. Durch die Gemeinsamkeiten und Unterschieden in den verschiedenen Stressfaktoren kann die Reaktion der Pflanze besser verstanden werden.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Methodische Überlegungen

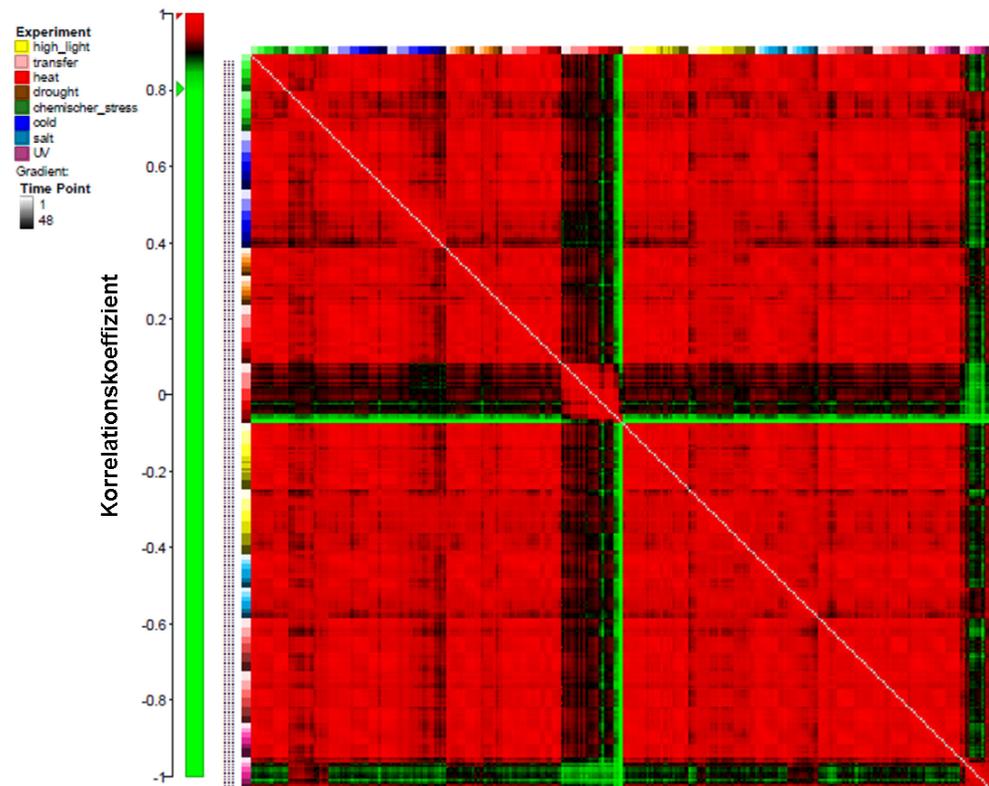
4.1.1 Einheitliche Phänotypisierung

Wie bereits im Teil 3.1 auf Seite 28 angemerkt, war es in dieser Arbeit von besonderem Interesse, einen einheitlichen Phänotyp für alle Stressfaktoren zu erreichen. Der Grund für dieses Ziel lag in der Komplexität der Stressantwort. Wie bereits in mehreren Experimenten beobachtet wurde, hängt das Ergebnis sehr stark vom experimentellen Design ab. Bei Anwendung verschiedener Methoden zeigten sich wiederholt unterschiedliche Resultate. Frühere Experimente, bei denen mehrere Stressfaktoren miteinander verglichen werden sollten, haben unterschiedliche, zum Teil widersprüchliche Aussagen ergeben [148, 189, 337, 304, 305]. Um sicherzustellen, dass die verschiedenen Stressfaktoren miteinander vergleichbar sind, musste darauf geachtet werden, dass die Pflanzen unter einem ähnlichen Stresslevel analysiert werden. Ein Beispiel bietet der Vergleich der Genanzahl im Hitzestress zwischen dieser Arbeit und den Experimenten von AtGenExpress Konsortium [148] oder der Mittler-Gruppe [256]. Im Gegensatz zum kontinuierlichen Hitzestress in dieser Arbeit wurden die Pflanzen einer transienten Hitzeperiode ausgesetzt. Hieraus resultierten in einer geringeren Anzahl an differentiell regulierte Genen. Hitze zeigte in der vorliegenden Arbeit die stärkste Antwort von allen Stressfaktoren. Es lässt sich deshalb nur vermuten, dass in der Pflanze wesentlich komplexere Prozesse ablaufen, als in den bisherigen Experimenten beobachtet wurden. Die Tatsache, dass in [148] bereits nach 6h fast keine differentiell regulierten Gene mehr nachgewiesen wurden, deutet darauf hin, dass das Aussetzen transientes Stress einen niedrigeren Effekt ausübt als die konstante Hitzestressaussetzung in dieser Arbeit erzielt wurde. Dagegen zeigt die Reaktion auf Kältestress eine kontinuierliche Steigerung an deregulierten Genen (Pflanzen wurden einem kontinuierlichen Kältestress ausgesetzt) (Abb. 3.11). Um Stressfaktoren über längere Zeitperioden miteinander vergleichen zu können, musste hier deshalb darauf geachtet werden, dass die Experimente unter ähnlichen Bedingungen stattfinden.

4.1.2 Microarray-basierte Analyse

Die Microarray-Technologie stellt eine sehr effiziente Strategie zur Informationserfassung von mehreren Quellen in einem Experiment dar. Auf einem Array kann man gleichzeitig die Expressionsveränderungen tausender Gene auf ein Mal untersuchen. Dadurch kann der genauere Ablauf der Signalübertragungswege analysiert werden, die entweder global oder unter spezifischen pflanzlichen Bedingungen stattfinden (Entwicklungsstadium, abiotischer oder biotischer Stress, bestimmte Mu-

Abbildung 4.1:
Korrelationskoeffizient der
Microarray-Experimente.
 Der Pearson's
 Korrelationskoeffizient wurde
 verwendet, um die
 Vergleichbarkeit aller
 Microarrays zu gewährleisten.
 Die Arrays wurden nach
 Stressfaktoren unterteilt und
 von früheren nach späteren
 Zeitpunkten sortiert. Die
 konstant hohen
 Korrelationswerte ($\geq 90\%$)
 dienen als Beweis dafür, dass
 trotz unterschiedlicher
 Stressfaktoren, Behandlungs-
 und Erntezeiten die
 verschiedenen Experimente
 miteinander vergleichbar sind.
 Die Experimente im mittleren
 Bereich (Hitzestress) sowie am
 rechten Ende (UV-Stress)
 weisen geringere Korrelationen
 auf. Diese Arrays wurden aus
 diesem Grund aus weiteren
 Analysen entfernt.



tationen oder Knock-down Experimente oder die Analyse bestimmter Pflanzenteile). Diese globale Analyse hilft dabei, das Wissen über die Zusammenhänge in der pflanzlichen Reaktion auf verschiedene Faktoren zu erweitern. Das hierfür optimierte Protokoll zur Sonderherstellung der Affymetrix[®] Chips aus Gesamt-RNA wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet (dieses Protokoll wurde ausführlich im Materialien und Methoden Teil auf Seite 15 beschrieben). Mit diesem Protokoll war es möglich, *Arabidopsis*-Pflanzen unter verschiedenen abiotischen Stressfaktoren simultan mit identischen Grundbedingungen zu analysieren. Dadurch konnte die Expression einer Vielzahl von Genen innerhalb einer Untersuchung mehrerer abiotischen Faktoren verglichen und eine detaillierte Momentaufnahme der pflanzlichen Reaktion auf verschiedene Stresssituationen geliefert werden.

In dieser Arbeit wurde die Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Pflanzen isoliert, die unter unterschiedlichen abiotischen Stressfaktoren gezüchtet wurden. Die Proben wurden gereinigt und in cDNA umgeschrieben. Diese wurden anschließend mit Biotin markiert und auf einem Affymetrix[®]-Array hybridisiert. Die Verwendung eines einzigen Protokolls stellte sicher, dass die Resultate aus den verschiedenen Experimenten vergleichbar waren. Im Rahmen dieser Analyse wurden sogenannte 'one-color'-Microarrays verwendet. Diese Technologie wurde bevorzugt, da hier mehrere Stressfaktoren an unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert wurden. Ein großes Problem in der Analyse mit diesen Arrays stellt die technische Varianz beim Vergleich unterschiedlicher Experimente dar. Die 'one-color'-Arrays wurden für diese Arbeit ausgewählt, da sie einen geringen zwischen-Array Variationskoeffizienten im Vergleich zu den 'two-colors' Arrays aufweisen. Hinzu kommt auch die hohe ($\geq 80\%$) qualitative Erkennungsrate der einzelnen Proben [49, 191]. Ein wesentlicher Faktor bei der Wahl der verwendeten Arraytechnologie in dieser Arbeit ist die mögliche Reproduzierbarkeit. Dieser Wert liegt bei Affymetrix-Arrays bei über 90% [19].

Aufgrund der Tatsache, dass Microarray-Experimente sogar unter optimalen Bedingungen eine

gewisse Variabilität zwischen den einzelnen Arrays vorweisen, ist eine Kombination aus technischen und biologischen Replikaten nötig, um die Genauigkeit und Sensitivität der Resultate zu gewährleisten. Wie in Abb. 4.1 zu sehen ist, wurden in dieser Analyse mehrere Arrays verwendet. Diese wurden nach Behandlungsfaktor und Erntezeitpunkt sortiert. Während die rote Farbe mit einem Korrelationskoeffizienten von über 90% fast überall zu finden ist, wurde hier eine Gruppe von Experimenten identifiziert, die unter sich zwar hoch korreliert sind, mit den anderen Stressfaktoren aber eine niedrige Übereinstimmung aufweisen (obwohl immer noch über 80%). Um das hohe Maß an Qualität in dieser Arbeit zu garantieren, wurde diese Gruppe für die Analyse der Resultate nicht mit einbezogen.

Obwohl die Pflanzen unterschiedlich behandelt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, und die Proben an verschiedenen Tagen bearbeitet wurden, kann hier generell gesagt werden, dass diese Arbeit einen hoch reproduzierbaren Microarray-Datensatz verschiedener abiotischer Stressfaktoren anbietet. Die sehr hohe Qualität, die verschiedenen Qualitätskontrollen, die den biologischen (und technischen) Replikas zugrunde liegt, die Vergleichbarkeit dieser Experimente sowie die Beachtung der strengeren und verlässlicheren Parameter erlauben hier eine starke, hoch korrelative In-Depth-Analyse der transkriptionellen Stressreaktion von *Arabidopsis thaliana*.

4.1.3 Festlegung der Parameter - Vergleichbare Methodik

Es wurden bereits mehrere Untersuchungen durchgeführt, bei denen einzelne Stressfaktoren oder ein bestimmtes Entwicklungsstadium (Salzstress [189], Hitzestress [157], Trockenheit [64], UV-Stress [320] uvm.) oder auch multiple Zeitreihen analysiert wurden [31, 148, 305]. Diese Arbeit unterscheidet sich von den restlichen früheren Analysen aufgrund der einheitlichen Vorgehensweise der Behandlung sowie durch die vorgenommenen Schritte zur Einhaltung der phänotypischen Merkmale. Die Untersuchungen wurden bei allen Stressfaktoren auf einem ähnlich starken Level geführt, um zu vermeiden, dass die identifizierten Differenzen im Expressionsverlauf aufgrund der unterschiedlichen Stressintensität entstehen. Dies hätte einen Vergleich der unterschiedlichen abiotischen Faktoren erschwert. Nur mit diesem komplexen Prozess zur Etablierung des experimentellen Designs konnte gewährleistet werden, dass Signalwege unter den unterschiedlichen Stressfaktoren ähnlich verlaufen können, und dass die Differenzen tatsächlich auf Unterschiede im eigentlichen Stress und auf die Art der Behandlung und die technischen Parameter zurückzuführen sind.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine langfristige Stressreaktion analysiert. Die Analyse der Pflanzen unter kontinuierlichem Stress über eine Zeitperiode von 48h ohne Unterbrechung liefert Antworten nicht nur auf die primäre Stressantwort, sondern auch über sekundäre oder gar tertiäre Signalübertragungswege, welche die Pflanze als Reaktion auf den Stress aktiviert bzw. reprimiert. Dabei wurde eine zweiphasige Reaktion identifiziert. Die frühe Antwort besteht hauptsächlich aus Schutzmaßnahmen, um den Stresseffekt zu mildern. In der zweiten Phase werden Prozesse geführt, welche die Stoffwechselbalance im Haushalt aufrechterhalten sollen.

4.2 Analyse der Genexpressionsprofile als Reaktion auf abiotischen Stress

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression bei *Arabidopsis* als Reaktion auf verschiedene abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, intensives Licht, UV-Licht, Salz, Trockenheit und chemischer Stress) sich sowohl in einem zeitlichen, globalen Muster zeigt, der bei allen Stressfaktoren auftritt, als auch einem stressspezifischen Verhalten folgt. Es wurde bereits früher erkannt, dass die Reaktion der Pflanze auf Stress sehr schnell stattfindet [337, 189, 148]. In Abbildung 3.11 auf Seite

45 wurden die abiotischen Stressantworten dieser Arbeit mit denen des AtGenExpress-Kompodiums verglichen. Dieser Vergleich verdeutlicht die Wichtigkeit der Einhaltung standardisierter Stressbedingungen. Während die Anzahl der differenziell regulierten Gene nach 1h bei beiden experimentellen Designs auf dem gleichen Level liegt, wurden in dieser Arbeit bis zu den späteren Zeitpunkten bei Hitzestress fast 1500 signifikant differentiell regulierte Gene mehr als im Referenzexperiment gefunden. Die Ursache für diese immensen Unterschiede sind sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Pflanzen in dieser Arbeit für eine Zeitperiode von 48h einen kontinuierlichen Stress ausgesetzt wurden. Der Grund für diesen immensen Unterschied liegt mit größter Wahrscheinlichkeit an der dauerhaften Stressaussetzung der Pflanzen für den gesamten analysierten Zeitraum bis 48h.

Für die Erstellung dieses Stresskompodiums wurden sieben Faktoren behandelt. Für eine ausführliche Analyse konzentriert sich die Arbeit auf folgende drei Stressfaktoren: Hitze, Trockenheit und UV-B-Licht. Dies wurde aus zwei Gründen entschieden. Diese drei abiotischen Stressfaktoren stellen die heutige Agrarwirtschaft vor große Probleme. Laut dem Report des zwischenstaatlichen Ausschusses für Klimaänderungen (IPCC) aus 2003 wurden die agrarwirtschaftlichen Erträge aufgrund der Hitzewelle in diesem Jahr um 30% reduziert [112]. Aufgrund des Klimawandels und ausgelöst durch Veränderungen in der Atmosphäre ist die bodennahe UV-Strahlung zu einem wichtigen Umweltparameter geworden. Der kontinuierliche Abbau der Ozonschicht steht im direkten Zusammenhang zur Intensivierung des UV-Stresses der Pflanzen. Laut Boyer [36] ist trockenheitsinduzierter Stress der Grund für fast 50% der globalen Ertragssenkung verantwortlich. Weitere Reports der IPCC über die Häufigkeiten der Trockenperioden stellen fest, dass diese in den nächsten 50 Jahren immer häufiger und stärker auftreten werden. Dementsprechend war die genaue Untersuchung dieser drei Faktoren (Hitze, Trockenheit und UV-Stress) in weiteren Analysen besonders praxisrelevant. Der zweite Grund wird in Abbildung 4.2 dargestellt. In dieses Diagramm wurde die relative Stressintensität aller Stressfaktoren nach der gewählten Zeitpunkten aufgetragen. Das Diagramm zeigt die mittlere Intensität einzelner Zeitpunkte für jeden Stress. Die Höhe der Y-Achse entspricht der relativen mittleren Intensität, während der Kreisumfang mit der Anzahl der Gene zu den einzelnen Zeitpunkten korreliert. Man erkennt das komplexe Verhalten der unterschiedlichen Stressfaktoren. Während Hitze-, Trockenheits- und UV-Lichtstressfaktoren ein sehr individuelles und variables Expressionsverhalten aufweisen, zeigen Kälte-, Licht-, Paraquat- und Salzstressfaktoren ein etwas einheitlicheres Expressionsmuster. Die Expression dieser letzten vier Faktoren bleibt relativ niedrig und verläuft konstant über alle Zeitpunkte. Hitze ist der markanteste Stress in dieser Arbeit. Hitzestress zeigt den stärksten Effekt und unter diesem Stress wird die größte Anzahl deregulierter Gene identifiziert. Trockenstress weist eine kontinuierlich steigende Expressionsintensität auf. Sehr deutlich ist hier die relativ starke Intensität im Vergleich zu der niedrigen Anzahl an differentiell regulierten Genen. Dies ist ein Beweis für die unter trockenheitsbedingten Bedingungen hervorgerufene Stressreaktion. UV-Stress, der einzige transiente Stress, zeigt eine konstante Senkung der mittleren Expressionsintensität und korreliert mit einer gegensätzlichen Erhöhung der Anzahl an differentiell regulierten Genen.

Interessant für das Verständnis der Stressantwort ist nicht nur die Reaktion der Pflanze auf einzelnen Stressfaktoren, sondern auch mögliche Beziehungen und Abhängigkeiten zwischen den Stressfaktoren. Pflanzen werden selten einem einzigen Stress ausgesetzt. Es handelt sich meistens um eine Kombination aus zwei oder gar mehreren Stressfaktoren (z.B. Hitze und Trockenheit mit oder ohne UV-Stress, Kälte und Trockenheit oder eine erhöhte Salzkonzentrationen in der Erde in trockenen Regionen). Die Erkenntnisse über solche Zusammenhänge spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Aufklärung der Reaktion auf abiotischen Stress [189, 213, 52, 161]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten auf eine teilweise zusammenhängende Reaktion hin. Es wurden hier Gruppen von Genen

identifiziert, die in mehreren Stressfaktoren differentiell reguliert wurden. Darunter kann man z.B. die bekannte Familie der Hitzeschockfaktoren sowie wichtige Transkriptionsfaktoren erkennen, die als Regulatoren für weitere Signalübertragungswege dienen. Dazu kommt der deutliche Unterschied in der Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS). Hier ist die Trennung zwischen der allgemeinen Stressantwort und den einzelnen Stressfaktoren, vor allem unter Hitzestress, sichtbar. Frühere Annahmen, die zugrunde legten, dass die gemeinsame Stressantwort eher in den früheren Stressperioden stattfanden [304, 305], konnten jedoch hier nicht eindeutig für alle Stressfaktoren bestätigt werden.

In dieser Arbeit scheint dies für den Hitzestress deutlich zutreffend zu sein. Tab. 3.9 zeigt eine deutliche Unterteilung in einer früheren allgemeinen und einer späteren spezifischen Antwort. Die Genexpressionsprofile in Tab. 3.15 sowie die Zeitreihenanalyse mittels LIMMA in Tab. 3.16 zeigen weiterhin eine klare zeitabhängige Expression. Dagegen weist UV-Stress keine solche klare Trennung zwischen einer früheren und einer späteren Phase auf, weder bei der Analyse der differentiellen Expression auf kategorischer Ebene (Tab. 3.28) noch bei der Akkumulation der TFBS-Gruppen (Tab. 3.29). Auch in der Analyse der trockenstressbedingten Veränderungen konnten keine markanten zeitabhängigen Unterschiede erkannt werden (TFBS-Analyse in Tab. 3.20 bzw. Zeitreihenanalyse in Tab. 3.23). Obwohl die restlichen Faktoren nicht weiter analysiert wurden, ist erkennbar, dass bei diesen Faktoren eine gewisse Unterteilung in zwei Phasen existiert. Es wurde eine frühe Phase in den ersten drei Messungen (1h-6h) und eine späte Phase (9h-48h) beobachtet. In Abb. 4.2 kann bei Kälte-, Salz- und etwas schwächer bei Lichtstress eine gewisse Trennung zwischen diesen zwei Perioden beobachtet werden. Kälte und Salzstress weisen beide eine kontinuierlich steigende Anzahl an differentiell regulierten Genen auf. Es scheint aber so als wenn bei beiden Faktoren zwischen 6h und 9h eine plötzliche Ruhephase beginnt, wobei die relative Stressintensität wieder sinkt. Es entsteht den Eindruck, als hätten hier zwei unterschiedliche Stressphasen unabhängig voneinander begonnen, die nach drei Messungszeitpunkten wieder beendet wurden.

In Abbildung 4.3 wurden verschiedene Stressfaktoren auf Gemeinsamkeiten analysiert. Das Venn-Diagramm in Abb. 4.3.A vergleicht diejenigen Genlisten, die für die Stressfaktoren Kälte, Salz-, chemischem Stress und Trockenheit gefunden wurden. Es wird sofort sichtbar, wie viele der Gene für jeden der Stressfaktoren spezifisch wirken und wie viele von diesen bei mehreren Stressfaktoren differentiell reguliert werden. 156 Gene wurden bei allen vier Stressfaktoren dereguliert. Über ein Viertel der Kälte-deregulierten und fast die Hälfte der Salzstress-deregulierten Gene werden von diesen beiden Faktoren gemeinsam kontrolliert. Dies zeigt eine bedeutende Korrelation in der pflanzlichen Stressantwort zwischen Kälte- und Salzstress und erklärt zum Teil das Verhalten in Abbildung 4.2. Der Vergleich zwischen Hitze, UV-Stress, Licht und Trockenheit resultiert in 155 Genen, die bei allen vier Faktoren signifikant dereguliert wurden (Abb. 4.3.B). Über 40% der Hitze- und knapp 60% der UV-Stress deregulierten Gene wurden von beiden Stressfaktoren beeinflusst, was auf eine signifikante Ähnlichkeit zwischen den beiden Stressreaktionen hinweist. Wie in Abb. 4.3.C deutlich sichtbar ist, weisen sogar Hitze und Kälte über 2000 Gene auf, die in beiden Stressfaktoren signifikant dereguliert wurden (35% der Gene unter Hitze und 58% unter Kälte). Ein Drittel davon wirkt sogar spezifisch unter Kälte- bzw. Hitzestress. Auch für Stressfaktoren mit komplett unterschiedlichem Expressionsverhalten, wie z.B. Hitze und Trockenheit oder Salzstress (Abb. 4.2) oder solche mit unterschiedlichen Phänotypen, wie z.B. UV-Stress und Kälte (Abbildungen 3.1.A und 3.4.A), wurden gemeinsamen Gene gefunden, was auf eine Stressantwort mit einem ähnlichen Verlauf hindeutet.

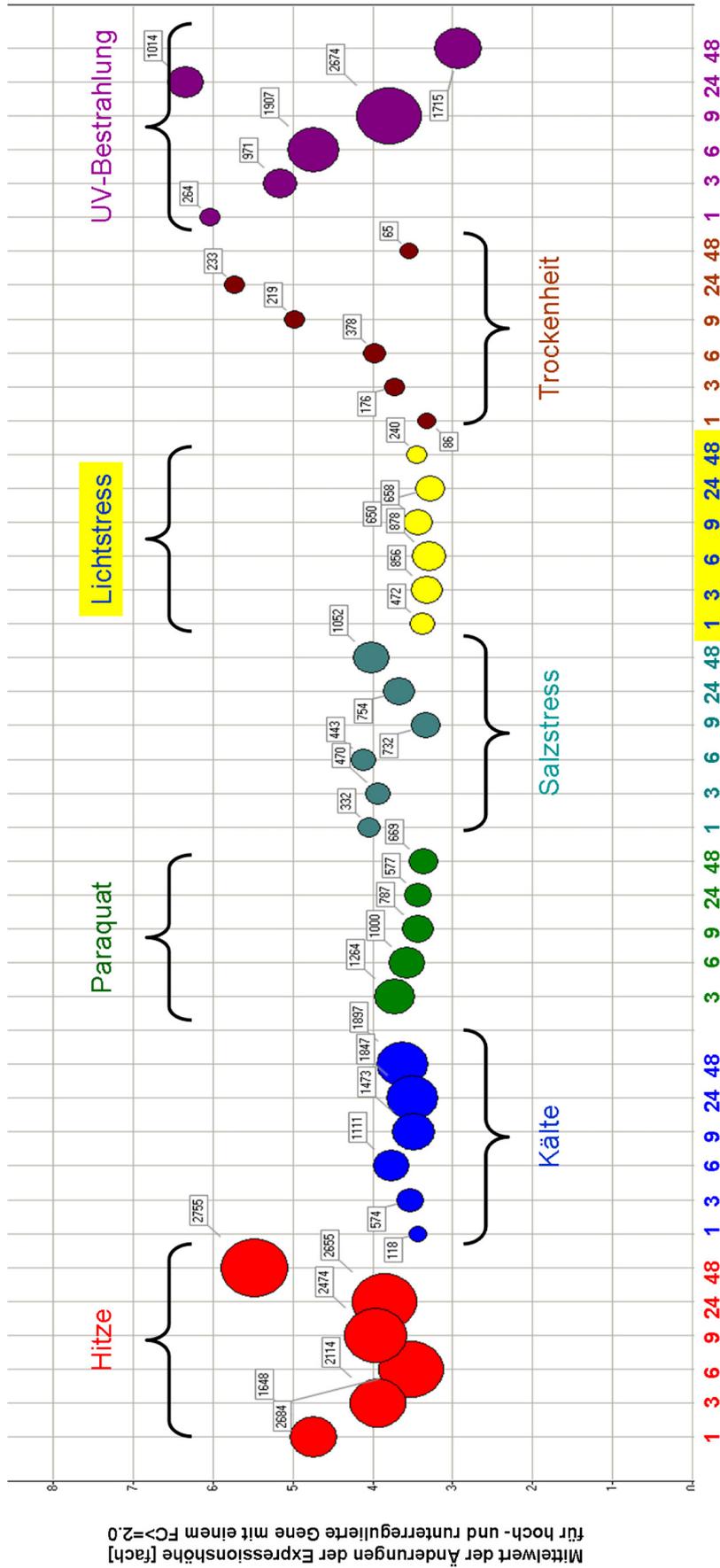


Abbildung 4.2: Die relativen Genexpressionsprofile der abiotischen Stressfaktoren. Aufgetragen wurde die relative mittlere Intensität (Y-Achse) für jeden Stress und Zeitpunkt (X-Achse) in Relation zu der Anzahl der differentiell regulierten Gene (Kreisumfang). Die Unterschiede im Expressionsverhalten sind markant. Während Hitze eine deutlich größere Anzahl an stark deregulierten Genen im gesamten Stressverlauf vorweist, konnte bei UV-Stress eine kontinuierliche Senkung, bei Trockenstress eine Steigerung der relativen mittleren Intensitäten beobachtet werden. Dagegen weist die relative Intensität der vier anderen Stressfaktoren ein konstantes Verhalten ohne größere Schwankungen auf. Die Expressionsmuster in Kälte-, Salz- und etwas schwächer auch Lichtstressfaktoren deuten auf ein zweiphasiges Expressionsverhalten hin. Nach drei Messpunkten kann einen Bruch im Expressionsmuster beobachtet werden, was auf einen gravierenden Wechsel im Expressionsverhalten der Pflanzen hindeutet.

Beim Vergleich derselben Stressfaktoren zu den separaten Zeitpunkten wurde festgestellt, dass die frühere Reaktion stressspezifischer wirkt (weniger Gene wurden gemeinsam identifiziert) als die Reaktion nach 48h (Abb. 4.3.C). Die funktionellen Eigenschaften der Gene, die in dieser Arbeit als stressspezifisch klassifiziert wurden, können weitere Erkenntnisse über die Mechanismen liefern, welche die verschiedenen Stresssignalreaktionen teilen. Genauso kann die stressspezifische Antwort einen Einblick gewähren, wie die Pflanze auf einzelne Stressfaktoren reagiert.

Eine stressallgemeine und stressspezifische Reaktion kann mit größerer Wahrscheinlichkeit durch die Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren eingeleitet werden. Das Gen RVE6 (MYB-Faktor, AT5G52660) wird in der mittleren Stressperiode spezifisch unter Kältestress exprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch verschiedene Phytohormone aktiviert (ABA, Ethylen, JA, Gibberellinsäure). Obwohl diese pflanzlichen Hormone eine allgemein bekannte Rolle in der pflanzlichen, abiotischen Stressreaktion spielen, wurde hier gezeigt, dass die verschiedenen Signalwege auf unterschiedliche Weise reguliert werden können. Dies erfordert die Aktivierung mehrerer Gene.

Die Generierung und der Abbau der ROS-Elemente wurden in dieser Arbeit mit mehreren Stressfaktoren assoziiert (u.a. Hitze - Abb. 3.16, Trockenheit - Abb. 3.27 oder UV-B - Abb. 3.25). Dieses Ergebnis stimmt mit früheren unterschiedlichen Quellen überein ([243, 158, 237] uvm.). Gene mit einer Rolle in der Signaltransduktion und -regulation der ROS-Elemente zeigen hier ein mehrdeutiges Verhalten. Während verschiedene CYP-Gene (Cytochrome P450, ROS-erzeugende Gene), wie z.B. CYP72A8, bei mehreren Stressfaktoren dereguliert wurden, weisen andere (z.B. CYP81F4) eine stressspezifische Aktivität auf. Ähnlich werden Gene des Glutathionsignalweges, die bei der Entgiftung der Pflanze eine Rolle spielen, differenziell reguliert. Während GSTF12 (AT5G17220) und GSR1 (AT5G37600) eine allgemeine Stressreaktion aufweisen, wurden GSTF9 (AT2G30680) stressspezifisch unter Hitze und GPX2 (AT2G31570) unter UV-Stress dereguliert.

Ähnliche Verhaltensmuster können hier bei den Gengruppen beobachtet werden, die als Reaktion auf Auxin, ABA oder andere Phytohormone exprimiert wurden. Das Auxin-regulierende Protein AT2G21210 zeigt eine konstante Herabregulierung bei mehreren Stressfaktoren. Das AIR12-Protein wurde unter Kälte hoch-, unter Hitze dagegen herabreguliert. AIR12 ist bekannt für seine Funktion bei der Stressreaktion in der Wurzel. Da in dieser Arbeit nur die Rosette für die Analyse benutzt wurde, deutet dies darauf hin, dass dieses Protein in weiteren pflanzlichen Bereichen aktiv ist. Eine weitere Möglichkeit wäre die Existenz eines bisher nur vermuteten, aber noch nicht identifizierten Stressrezeptors, der das Signal erkennt und eine Signalkaskade aktiviert. Dadurch können in anderen Pflanzenteilen Vorbereitungen gegen Stress getroffen werden. AT2G46690, ein SAUR-like Auxin-responsive Protein, wurde dagegen nur bei Hitze signifikant dereguliert. Für dieses Protein konnten keine Funktionen zugeordnet werden.

Microarrayanalysen konzentrieren sich meist auf Gene mit einer relativ starken Erhöhung der Expressionsintensität (der sogenannten Fold Induction, FC) [280, 51, 161, 189]. Da aber bereits kleine Expressionsveränderungen eine bedeutende Wirkung auf die Regulierung metabolischer Signalkaskaden haben können, bei denen diese schwach deregulierten Gene ggf. eine Rolle spielen, führt diese Vorgehensweise zu einem Informationsverlust. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit bei der Anreicherungsanalyse der Gensets darauf geachtet, dass nicht nur die Stärke der Veränderungen, sondern auch die Klassenzugehörigkeit untersucht wurde. Es wurden hier Gene mit einer Veränderung in mehreren Stressfaktoren identifiziert, die bisher keiner bekannter Funktion zugeordnet werden konnte. Die Tatsache, dass ein Gen einen erhöhten FC-Wert aufweist, deutet nicht unbedingt darauf hin, dass es eine Schlüsselrolle bei der Koordinierung physiologischer bzw. stressspezifischer (oder allgemeiner) Reaktionen ausübt [70]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine große Menge an Genen mit eher

milden FC-Werten eine ebenso wichtige Rolle spielen, wenn sie alle gemeinsam an einer bestimmten zellulären Reaktion beteiligen.

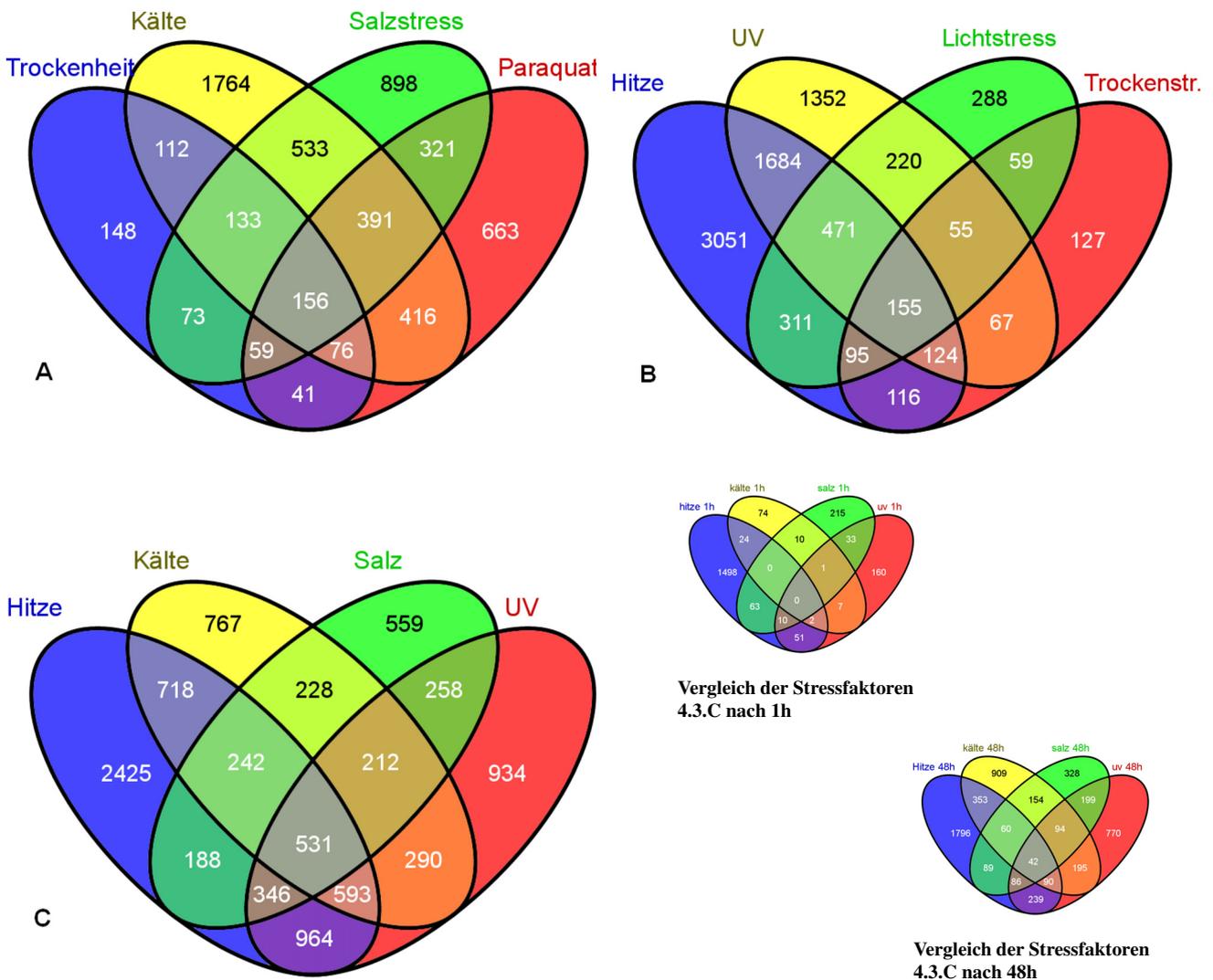


Abbildung 4.3: Der Vergleich verschiedener Stressfaktoren auf gemeinsam bzw. spezifisch deregulierte Gene. Der Vergleich zwischen den Stressfaktoren der osmotischen Stressantwort (A) zeigt eine sehr starke gemeinsame Antwort. Viele deregulierten Gene des Hitze- und UV-Stresses werden von beiden Faktoren im Stressverlauf reguliert (B). Interessant hier ist die Tatsache, dass viele der Trockenstress-veränderten Gene ebenfalls unter Hitze und/oder unter UV-Stress differenziell reguliert wurden. Das Venn-Diagramm der Temperatur-abhängigen Stressfaktoren (C) deutet auf eine hohe Ähnlichkeit nicht nur zwischen Hitze und Kälte hin, sondern zeigt auch, dass Stressfaktoren, die angeblich nicht gleich wirken sollten einen gewissen Anteil gemeinsam regulierter Gene vorzuweisen haben. Die Aufteilung in Früh- und Spätphase (C) gibt hier einen viel stärkeren gemeinsamen Anteil der verglichenen Stressfaktoren nach 48h im Vergleich zum Beginn der Behandlung wieder. Diese Venn-Diagramme wurden mittels VENNY erstellt [235].

Eine Kombination verschiedener Stressfaktoren wie es regelmässig in der Natur vorkommt (wie z.B. Hitze und Trockenheit), ist einer der häufigen Faktoren für den reduzierten Ertrag bzw. die limitierte Ertragsfähigkeit kommerzieller Nutzpflanzen [213]. Das Verständnis dieser multiplen Stressantwort stellt deshalb einen sehr wichtigen Schritt für die Ertragsteigerung dar. Der Weg zur vollständigen Problemlösung ist vermutlich noch lang, wenn die Anzahl der in dieser Arbeit gefundenen unbekanntenen Gene berücksichtigt wird. Für die Bestimmung von Schlüsselgenen für die allgemeine Stressantwort sind weitere Experimente nötig. Eine wichtige Entscheidung ist, die richtigen genetischen Marker zu identifizieren, die eine solche Schlüsselposition ausüben. Eine interessante Heraus-

forderung wird sein, die Genexpressionsprofile der Gene mit einer Rolle in multiplen Stressfaktoren so zu manipulieren, dass diese nicht zur Senkung der Pflanzen-Fitness führen. Dies könnte besonders dann von Bedeutung sein, wenn diese Gene mögliche Schlüsselrollen in metabolischen Prozessen ausüben. Hinzu kommt, dass die erweiterte Identifizierung solcher Gene eine flächendeckende, system-, bzw. stressorientierende Datenbank der pflanzlichen Stressantwort liefern könnte. Ein solches Kompendium wird bei biotechnologischen Methoden zur Erhöhung des Ertrags und der Resistenz der Pflanzen eine bedeutende Rolle haben.

4.3 Die Reaktion der Pflanze auf erhöhte Temperaturen

Erhöhte Temperaturen werden von der Pflanze als Hitzestress empfunden. Die Reaktion der Pflanze auf den Stress ist sehr komplex und beinhaltet mehrere Transkriptionsfaktoren. Es wurde bereits Vieles über die Rolle verschiedener Hitzeschockfaktoren in der Regulation des Hitzestresses herausgefunden. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, spielt z.B. HsfA2 eine zentrale Rolle bei der Reaktion auf Hitze (Abb. 3.16). HsfA2 dient als ein Schlüsselgen bei der Aktivierung und Abschaltung mehrerer Gene in verschiedenen metabolischen Funktionen. Es reguliert Gene für den Abbau von ROS-Elementen (APX1, APX2 oder AOX1A), beeinflusst Gene im Energie- und Kohlenhydratmetabolismus und hat sogar einen indirekten Einfluss auf verschiedenen Gene der Seneszenz (wie z.B. BCB oder manche WRKY-TF). Es konnte hier gezeigt werden, dass unter Hitze mehrere mitochondriale Gene stark hochreguliert werden (RPS4, NAD4, -7, COX1, -3 uvm). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der primären Antwort in der Regulation der RNA- und Proteinsynthese, als auch in der Sekundärreaktion bei der Kontrolle des Energiemetabolismus. 13 von 30 deregulierte Genen wurden über alle Zeitpunkte hochreguliert. Die restlichen Gene wurden in späteren Zeitpunkten aktiviert. Dies lässt vermutlich auf die Erhöhung der Mitochondrienzahl zurückzuführen. Die Pflanze benötigt mehr Energie, um sich gegen den Stress zu schützen und muss entsprechende Metabolismen aktivieren. Die erhöhte Energieproduktion und die durch den Stress fehlerhafte Elektronentransformation führt zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration und schließlich zur Einleitung des programmierten Zelltodes. Das Expressionsmuster von HsfA2 wurde bereits in vielen Details analysiert [273, 228]. HsfA2 wird durch H_2O_2 reguliert. Mehrere HSPs sowie Gene des ROS-Metabolismus werden von ihm kontrolliert. Dagegen ist noch nicht viel über seine Funktion in der Repression verschiedener sekundärmetabolischer Signalwege bekannt. HsfA2 wurde bereits im ersten Messungszeitpunkt fast 200fach höher exprimiert und sinkt dann kontinuierlich. Dies deutet darauf hin, dass dieses Gen zu Beginn des Stresses seine Schlüsselrolle ausübt und die darunterliegenden Prozesse aktiviert. Passend zu diesem Verhalten zeigen verschiedene Schlüsselgene im Photosystem I und II (Abb. 3.17), sowie Gene des Kohlenhydratmetabolismus, eine konstante Herabregulierung, die nach 24h (GH9) bzw. 48h (GBSS) ihren niedrigsten Punkt erreicht haben. Hinzu kommen mehrere Gene unbekannter Funktionen, die ebenfalls mit diesem Verhalten korrelieren. Es werden weitere Analysen nötig, um ein vollständiges Bild von HsfA2 und den von ihm distal-regulierten Genen zu erhalten. Obwohl die Pflanzen ständig unter Stress standen, wird die Expression dieses Gens schwächer. Da in dieser Arbeit die Regenerierungsphase nicht untersucht wurde, lässt sich die Rolle von HsfA2 in Bezug zu dieser Phase nicht feststellen. Die Herabregulierung trotz des Stresses könnte jedoch darauf hindeuten, dass es eher eine weitere Rolle in der Akklimatisierungsphase ausübt.

Nicht viel ist über das Zusammenspiel der verschiedenen Hsfs bekannt. HsfA2 zeigt fast die stärkste Expression unter den HS-Faktoren und fast allen HS-regulierten Genen. Höhere Expressionswerte zeigen nur einige HSP (sowohl chloroplastische, als auch mitochondriale oder nukleäre Proteine) und

das BAG6-Gen, das für die Einleitung der Apoptose und die Reaktion auf Pathogenität zuständig ist. Weitere HS-Faktoren weisen ein Expressionsverhalten auf, das dem vom HsfA2 ähnlich verläuft. Sie erreichen ein Expressionsmaximum nach 1h und werden anschließend kontinuierlich herabreguliert (Tab. 3.5). Die Daten in dieser Arbeit sind nicht ausreichend, um konkrete Zusammenhänge über die genauen Funktionen dieser Hitzestressfaktoren nachweisen zu können. Es lässt sich deshalb anhand der Ähnlichkeit des Expressionsverlaufs lediglich spekulieren, dass diese Faktoren auf dieselbe Weise kontrolliert werden. Durch diese Ähnlichkeiten lassen sich mögliche Abhängigkeiten voneinander postulieren oder auf die Existenz eines gemeinsamen bisher nur hypothetischen Stressrezeptors spekulieren, der diese Gene auf ähnliche Weise reguliert. Die Ergebnisse in dieser Arbeit liefern jedoch bestimmte Kandidaten, die zusammen mit den Hitzeschockfaktoren die pflanzliche Stressreaktion kontrollieren können.

Auch wenn die Hitzestress-induzierte Reaktion eine Aktivierung der Hsf-Gene zur Folge hat, sind diese nicht die einzigen hochregulierten Transkripte. Es wurden über 6000 Gene identifiziert, über 11% wurden bereits nach 1h intensiver exprimiert. Die Diversität der multiplen Hsfs lässt vermuten, dass diese Faktoren verschiedene, wenn auch zum Teil überlappende Funktionen, in der stressinduzierten Transkriptionsregulation besitzen. Das Zusammenspiel zwischen Redundanz und Spezifität dient als eine Methode, die Transkriptionsrate der HS-Gene differentiell zu kontrollieren und dadurch die Interaktionen mit anderen regulatorischen Elementen zu gewährleisten. Bei anderen Organismen (z.B. Vögeln) wurde bereits die Ko-Expression verschiedener HS-Faktoren sowie die Interaktion zwischen Hsfs und anderen regulatorischen Elementen beobachtet [217]. Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren (MYB-, MYC-, DREB- oder WRKY-Gene) in dieser Analyse kann die Hypothese bestätigen, dass auch bei den Pflanzen gewisse regulatorische Signalübertragungswege aktiviert werden, die den zellulären Stress mit dem Wachstum verbinden. Die phänotypischen Auswirkungen der Hitze auf die Pflanze (Abb. 3.1 zeigt kleinere Pflanzen mit weniger Blättern) verstärkt diese Annahme.

Wie vorhin erwähnt, ist häufig nicht die Stärke der Antwort eines einzelnen Transkripts von Bedeutung, sondern es kann manchmal die Ansammlung moderater Veränderungen ebenso eine wichtige Rolle spielen. Die Gen-Set-Anreicherungsanalyse (GSEA) untersuchte Transkriptionsveränderungen auf der kategorischen Ebene. Die extreme Intensitätserhöhung bei den Gengruppen der Translation, Transkription, Proteinmodifikationen und mehreren Signal- und Transportmechanismen deutet auf die funktionelle Komplexität der pflanzlichen Stressantwort hin. Die GSEA wurde hier verwendet, um statistisch signifikante Gensets auf kategorischer Ebene zu identifizieren. Die Analyse von Genlisten, ohne Festlegung explizit auf einzelne Genexpressionsmuster kann subtile Veränderungen im Datensatz erkennen lassen. Die Ergebnisse der GSEA-Analyse in dieser Arbeit verdeutlichen die Komplexität der pflanzlichen Reaktion auf Hitze. Die Pflanze fährt die Translations- bzw. Transkriptionsmaschinerie hoch. Untereinheiten der RNA-Polymerasen I und II, von Transkriptionsinitiationsfaktoren (TFIIA, D und F) sowie Translationsinitiations- (eIF-3d, -3b, -2 uvm) oder -elongationsfaktoren werden aktiviert und kontinuierlich stark exprimiert. Die ribosomale Aktivität wurde verstärkt. Weiterhin interessant ist hier die erhöhte Aktivität mitochondrialer Transkriptions- und Translationselemente, was mit der erhöhten Expression mitochondrialer Gene (COX- und NAD-Gene) übereinstimmt. Das hat zur Folge, dass die Elektronentransportkette (ETC) stärker arbeitet und mehr negativ-geladene Elektronen produziert. Während die ETC-Rate steigt, wird aufgrund des Hitzestresses die zelluläre Aktivität in den für den Abbau der überschüssigen Elektronen verantwortlichen Organellen verlangsamt. Gene der Photosynthese I und II wurden hier vom ersten Messungszeitpunkt an herabreguliert.

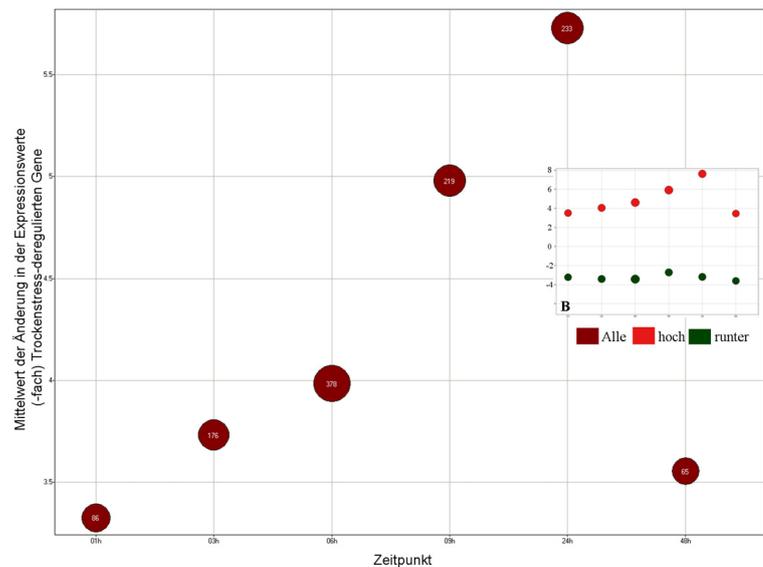
Kontinuierlicher Hitzestress führt zuerst zur Verzögerung des Wachstumsprozesses. Die Senkung

der Zellbewegung, des Zellwachstums und der Mikrotubuli- sowie der Zytoskelettsaktivität sind ein deutliches Zeichen hierfür. Wenn die Pflanze dem Stress weiter ausgesetzt wird, führt dies zu irreversiblen Gewebeschäden und zur Einleitung des programmierten Zelltodes. Die Anzahl an freien Elektronen wächst ständig und so auch die zelluläre ROS-Konzentration. Dadurch steigt auch der oxidative Stress.

Interessante Resultate lieferte hier die Analyse der Transkriptionsfaktorbindestellen (TFBS). Die deutliche Aufteilung der überrepräsentativen Promotorbindestellen der deregulierten Gene unterstützt die Theorie von einer zweiphasigen Stressantwort. In Tabelle 3.9 wird die Rolle der Hsf-Gene in der Anfangsphase des Stresses sichtbar. Gene mit einem HSE-Promotormotiv wurden in den ersten zwei Messungen angereichert identifiziert. Es ist bereits bekannt, dass Hsf-Gene eine sehr globale Rolle in der Stressregulation spielen. Sie binden nicht nur an Loci, die mit dem Hitzestress in Verbindung gebracht werden können, sondern regulieren Gene durch das Binden an unterschiedlichen TFBS [338, 90]. Die Tatsache, dass ein ähnliches Ergebnis für die HSE-Motive und die Motive für die allgemeine Stressantwort gefunden wurde, beweist die Vielfältigkeit der HS-Faktoren. Viele Gene mit einem Bindestellenmotiv für Hsf besitzen ebenfalls ein oder mehrere Motive aus der Gruppe des allgemeinen Stresses (>86 gemeinsame Gene). Weitere Analysen dieser Gene können helfen, den Übergang zwischen der allgemeinen und spezifischen Stressreaktion besser zu verstehen. In den weiteren Messungspunkten wurden die Gene mit dem HSE-Motiv nicht mehr wiedergefunden. Dagegen weisen viele der Gene mit einem der HS-spezifischen Motive eine stressspezifische Antwort unter Hitze auf. In dieser Arbeit konnte zum ersten mal ein Zusammenhang zwischen einer hitzestressspezifischen Reaktion und bestimmten Transkriptionsfaktorbindestellen beobachtet werden. Eine weitere Analyserichtung wäre festzustellen, ob eine bestimmte Korrelation zwischen den Genen existiert, die in den früheren Zeitpunkten von den HSE-Motiven reguliert wurden und Gene, die eine spätere Reaktion auf TFBS mit den Motiven der allgemeineren Stressantwort aufweisen. Ein solcher Zusammenhang würde weitere Hinweise liefern können, wie die Pflanze ihren metabolischen Haushalt als Reaktion nicht nur auf den Stress selbst, sondern auch auf die Dauer bzw. Intensität des Stresses ändert. Die in dieser Arbeit verwendete Liste der TFBS ist bei weitem noch nicht vollständig. Es werden kontinuierlich sowohl neue Transkriptionsfaktoren (-familien) als auch neue Bindestellen im Genom gefunden. Diese Motive sowie weitere Analysen mit neueren Technologien (wie z.B. Chip-ChiP oder ChiP-Seq Methoden) werden weitere bisher unbekannte Erkenntnisse über die Kontrolle der Transkriptionsfaktoren über deren Zielgene liefern können. Diese Beziehungen spielen eine unmittelbare Rolle beim Verständnis der globalen Hitzestressantwort.

Die transkriptionelle Stressreaktion wurde bereits bei früheren Studien als Modell für die molekulare Stressreaktion, DNA- und Chromatinreorganisation und regulatorischen Mechanismen verwendet, die mit dem Stress assoziiert sind. Ziel war die Entschlüsselung der molekularen Strategien zum Schutz vor Stress. Die Rolle der Hsfs wurde weitgehend, wenn auch nicht komplett, für diesen Prozess untersucht. In dieser Arbeit konnten weitere Transkriptionsfaktoren mit zum Teil hitzespezifischer Regulation identifiziert werden. Die Funktion dieser Transkriptionsfaktoren, die Identifizierung ihrer Zielgene und die Bestimmung der von ihnen kontrollierten Signalübertragungswege werden Aufschluss über den Hitzestress und die Art der pflanzlichen Reaktion geben können.

Abbildung 4.4: Die Expressionsintensität der differentiell regulierten Gene unter Trockenheitsbedingungen. Im Vergleich zu den anderen Stressfaktoren werden unter Trockenstress relativ wenig Gene dereguliert (Tbl. 3.4). Die Intensität dagegen wurde im Stressverlauf deutlich stärker. Sie wächst kontinuierlich über die Zeit bis 24h und bricht bei 48h stark ein. Es ist interessant zu sehen (B), dass diese Veränderungen fast ausschließlich den hochregulierten Gene zu verdanken ist. Die gemittelte Expression nach 24h ist mit knapp 8 fast die stärkste in dieser Arbeit. Die Kreisfläche repräsentiert die Anzahl der deregulierten Gene. Die Y-Achse stellt die gemittelte Expressionsstärke aller (A) oder hoch- und herabregulierten (B) Gene über die Zeit (X-Achse) dar.

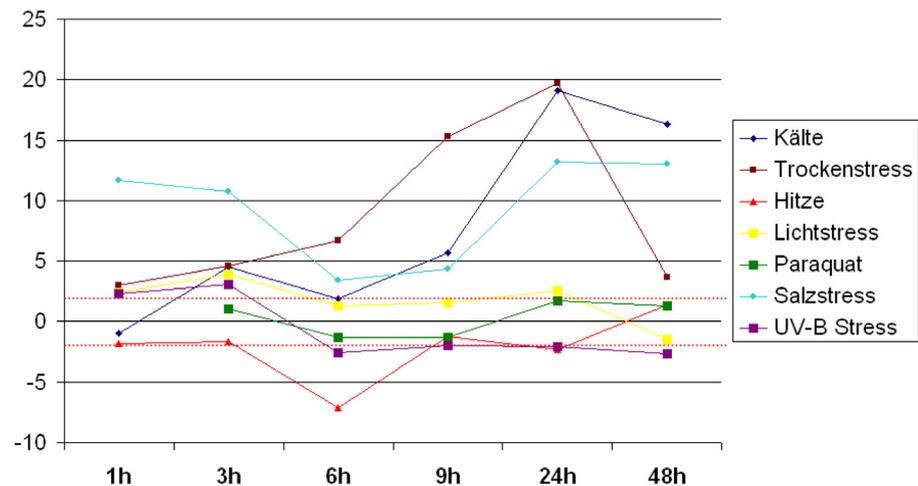


4.4 Die Identifizierung neuer stressregulierender Gene unter trockenheitsbedingten Stressbedingungen

Trockenstress stellt einen der wichtigsten abiotischen Stressfaktoren dar. Es konnte bereits vor zwei Jahrzehnten festgestellt werden, dass Trockenstress Störungen im Pflanzenmetabolismus und als Folge in deren Entwicklung hervorruft [37]. Transkriptomanalysen der dem Trockenstress ausgesetzten *Arabidopsis*-Pflanzen haben einen Überblick über dessen Genregulation gegeben [279, 280]. Es wurde gezeigt, dass sich Mitochondrien ebenfalls an verschiedenen metabolischen Prozessen beteiligen [242]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Gene der Phosphorespiration (u.a. ATPasen) oder des Energiemetabolismus (Ascorbatsynthasen, Trehalosen, Photosynthesegene uvm.) aufgrund des Stresses dereguliert werden. Insbesondere wurde in dieser Arbeit auf die deutlich starke Beteiligung des Phytohormons ABA in der Stressregulation hingewiesen. Die Analyse der Signalübertragungswege, gezeigt in Abb. 3.26, stellt die Vielfältigkeit von ABA als Regulator mehrerer metabolischer und Entwicklungsprozesse dar. Die Beteiligung des ABA-Hormons ist zu allen Zeitpunkten zu sehen. Darunter sind auch wichtige Transkriptionsfaktoren wie DREB1, ERD10, RD29, RAB oder COR Gene. Sie zeigen zum Teil eine extrem hohe Intensität (RAB18>115fach, COR12>78fach). Die Darstellung in Abb. 4.4 dient als klare Zusammenfassung der Reaktion zwischen der niedrigen Anzahl an deregulierten Genen und deren relativ starken Expression. Obwohl die Anzahl der Gene ein Zehntel der hitzestressderegulierten Gene ausmacht, weist die relative Intensität der trockenheitsbedingten Gene einen fast genauso hohen Wert wie unter Hitze auf. Es lässt sich deshalb vermuten, dass die Pflanze für den Schutz vor Trockenheit zwar nicht sehr viele einzelnen Gene benötigt, dafür aber werden diese stark exprimiert.

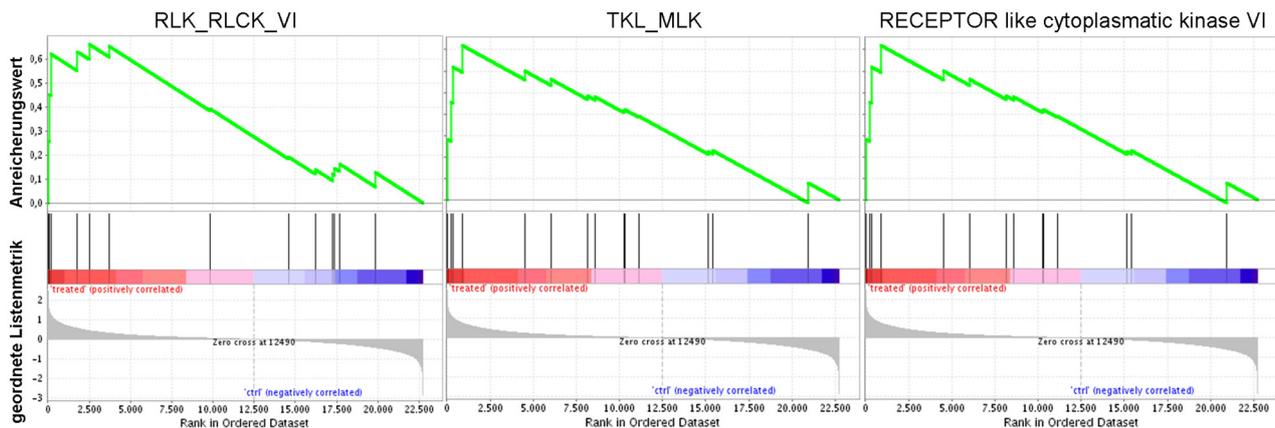
Die Vorversuche in dieser Arbeit wurden durchgeführt, um einen einheitlichen Phänotyp in allen Stressfaktoren sicherzustellen (Seite 12). Deshalb kann trotz geringer Anzahl an differentiell regulierten Genen davon ausgegangen werden, dass der Stress auf einem ähnlichen Level wie bei den anderen Stressfaktoren liegt. In Abbildung 3.2 wurde die Auswirkung des Trockenstresses auf die Pflanze dargestellt. Die Wachstumsrate verlangsamt sich, die Blätter rollen sich nach Innen, erste Anzeichen von Nekrose sind bereits sichtbar und die Hauptwurzel verlängert sich auf der Suche nach Wasser. Diese Symptome sind die typischen Merkmale einer dem Trockenstress ausgesetzten Pflanze. Dies lässt ver-

Abbildung 4.5: Die differentiell regulierte Expression des RD29A-Gens unter allen Stressfaktoren. Mit Ausnahme von Paraquat wurde RD29A in allen Stressfaktoren differentiell reguliert. Die stärksten Intensitäten weisen die Faktoren des osmotischen Stresses auf, während es unter Hitze sogar herabreguliert wurde. Unter UV-Stress wurde die Expression von RD29A im Beginn der Stressphase erhöht und in den letzteren Messungspunkten wieder signifikant gesenkt. Die rote punktierte Linie stellt den Schwellenwert von $FC \geq 2$ für die Signifikanz der deregulierten Expression dar.



muten, dass die Anzahl der Gene keinen Einfluss auf die Stressintensität hat. Es wird die Hypothese gestellt, dass Trockenstress im Vergleich zu den anderen Stressfaktoren weniger Gene (oder weniger zentrale Gene mit einer vergleichbaren starken Deregulation) braucht, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Eine Möglichkeit wäre, dass der Trockenstress weniger komplex geregelt wird als z.B. Hitze mit über 6000 differentiell regulierten Genen. Eine zweite Option wäre der geringere Bedarf und die entsprechend niedrigere Nutzung weniger Signalkaskaden mit unterschiedlichen Genen. Diese Zentralisierung der Stressantwort würde die Hypothese einer allgemeinen Stressantwort unterstützen.

Trockenstress kommt selten allein. Oft wird Trockenheit von extremen Temperaturbedingungen oder Salzkonzentrationen begleitet. Aus diesem Grund kommt es nicht überraschend, dass mehrere Gene sowohl unter Trockenstress als auch unter Salzstress dereguliert wurden. Diese große Ähnlichkeit zu erhöhten Salzkonzentrationen lässt sich zum Teil auf die Koexistenz der ABA-abhängigen und -unabhängigen Signalwege zurückführen [25, 33, 181]. Ein gutes Beispiel ist RD29A (in dieser Arbeit über 78fach hochreguliert). RD29A wurde nicht nur bei Trockenstress, sondern auch unter Kälte und Salzstressbedingungen induziert. Dieses Gen besitzt sowohl das ABRE-Motif, das von ABA-abhängigen Genen gebunden werden kann, als auch ein DRE-Motif, das von den ABA-unabhängigen Genen gesteuert wird. Die Expression von RD29A kann durch die Bindung von Genen an diesen beiden Motiven reguliert werden [322, 225]. Die Gensets-Anreicherungsanalyse der Trockenstress-deregulierten Gene liefert einen weiteren Beweis für die Komplexität der Stressantwort. Wie in Abbildung 4.5 sichtbar, reagiert RD29A nicht nur auf Trockenheit, sondern spielt eine regulatorische Rolle bei allen anderen Stressfaktoren (mit Ausnahme von Paraquat-behandelten Pflanzen). Ein möglicher Grund für dieses Verhalten ist die Anwesenheit dieser zwei Bindestellenmotive für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Es lässt sich vermuten, dass diese zwei Motive auf verschiedene Art aktiviert werden können. In bestimmten Fällen können sie zusammen, in anderen Situationen aber separat wirken. Dadurch werden auch die Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen der osmotischen Stressfaktoren (Trockenheit, Kälte, Salz) und denen von Hitze bzw. zum Teil UV-Stress hervorgerufen, wobei in der ersten Gruppe die Intensitäten deutlich höher liegen als bei UV-B Stress. Hitzestress wirkt herabregulierend auf dieses Gens. Um mehr über die unterschiedlichen Möglichkeiten der RD29A-Regulierung zu erfahren, muss zuerst entschlüsselt werden, wie diese beiden Bindestellenmotive miteinander arbeiten und wann sie auch getrennt eine Wirkung vorweisen können. ABA-abhängige Gene wurden in allen hoch- und herabregulieren Prozessen identifiziert. Diese Reaktionen verstärken sich, je länger der Stress andauert. Die TFBS-Analyse zeigte, wie wichtig ABA für die Re-



RLK_RLCK IV	TKL_MLK	receptor like kinase VI
264479_at	254269_at	264479_at
260924_at	247918_at	260924_at
249588_at	254155_at	249588_at
247170_at	251063_at	247170_at
247920_at		247920_at

Abbildung 4.6: Deregulierte Kinasen aufgrund des trockenheitsbedingten Stresses. Diese drei Gruppen der Kinaseklassen wurden in der GSEA Analyse als überrepräsentativ identifiziert. All diesen Kinasen wurden bisher keine Funktion zugeordnet. Weitere Analyse sollen helfen, festzustellen, auf welcher Weise diese Kinasen bei der Regulation und der Kontrolle des Trockenstresses beteiligt sind.

gulation der Trockenstressantwort ist. Es konnten keine Bindestellen im proximalen Promotorbereich gefunden werden, die stressspezifisch überrepräsentativ akkumulierten. Fast alle Motive wurden hier unter der allgemeinen Stressantwort klassifiziert (diese Motive wurden so genannt, weil sie bei allen Stressfaktoren in verschiedenen Zeitpunkten und Konzentrationen entdeckt wurden). Die restlichen drei Motive beteiligen sich an der Regulation der Gene mit einer Funktion im osmotischen Stress (dies beinhaltet die drei Faktoren Kälte, Salz und Trockenheit, welche unter anderem einen Einfluss auf den osmotischen Druck innerhalb der Zelle haben).

Homeoboxgene wie AtHB7 oder AtHB12 sind prominente Trockenstressregulatoren, die für ihre Rolle in der Kontrolle des Pflanzenwachstums unter Stress bekannt sind. Die Tatsache, dass diese (und ähnliche) Gene auch nach 48h noch hochreguliert wurden, deutet auf die mögliche Aktivierung der Akklimatisierungsprozesse hin. Diese Transkription wurde vermutlich deshalb gestartet, um die längere Stressperiode zu überwinden. Weitere Gene, die ebenfalls eine mögliche Rolle bei der Akklimatisierung der Pflanze spielen, sind verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. NAC-Familie in Abb. 3.24 [100]), Proteinphosphatasen (ABI, IPS) oder Kinasen (wie z.B. CIPK5). Im Gegensatz zu Hitzestress wurde hier eine erhöhte Aktivität sekundärmetabolischer Signalübertragungswege beobachtet. Die erhöhte Aktivität in der Lignin/Flavonoid-Metabolismen verhilft der Pflanze, ihre Wasserverlustsrate zu reduzieren. Die Lignin-Moleküle üben eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Wasserhaushalts in der Pflanze aus. Durch die Vernetzung der Zelle mit den hydrophobischen Ligninketten werden die hydrophylen Xylemelemente wasserabweisend. Die Pflanze verliert dadurch weniger Wasser. Eine weitere Rolle der Ligninketten ist die Aufrechterhaltung der zellulären Struktur. Sie verleihen ihr mehr Integrität. Durch den Wasserverlust wächst der Turgordruck und ohne die Lignin-Moleküle würden die pflanzlichen Zellen dem Druck von Außen nicht Stand halten und kollabieren [123].

Eine der Stärken der GSEA ist die Identifizierung über-repräsentativer Gengruppen, die allein durch deren Fold-Induktion nicht aufgefallen wären. Bei deren Analyse wurden dadurch mehrere

bisher nicht-annotierte Transkriptionsfaktoren und Kinasen mit einem deregulierten Verhalten unter trockenheitsbedingtem Stress identifiziert (Abb. 4.6). Dabei handelt es sich um verschiedene Kinasen der RLK- und TKL-Klassen (Receptor-Like bzw. Tyrosinkinase). Diesen Genen konnte bisher keine funktionelle Rolle im metabolischen Haushalt der Pflanze zugeordnet werden. Wie aus dieser Arbeit postuliert werden kann, spielen diese Kinasen eine Rolle in der Trockenstressregulation. Der Kohlenhydratmetabolismus zeigt unter Trockenstress ein zwiespältiges Verhalten. Die Glycoproteine (Zellwandproteine) wurden in der Anfangsphase signifikant herabreguliert [57]. Dagegen wurde die Glucanproduktion in der mittleren Stressperiode intensiver betrieben. Der Stärkeabbau wird erhöht, vermutlich als Ersatz für die Herabregulierung der Kohlenhydratsynthese. Weil die Glykolyserate herabgesetzt wurde, müssen die langkettigen Stärkemoleküle abgebaut werden. Die Pflanze verwendet diese Bausteine als alternative Energiequelle. Es wurde hier gezeigt, dass verschiedene Prozesse widersprüchliche Verhaltensmuster vorweisen. Die Akkumulation von Glycoproteinen wurde bereits bei Untersuchungen zur ABA-Funktion in Trockenstress-ausgesetzten Pflanzen beobachtet [205]. Es lässt sich hier vermuten, dass die Akkumulation dieser Proteine zur einer Art Schutzmechanismus gehört, dem die Pflanze aktiviert, um sich vom Stress erholen zu können. Als weitere Hypothese wurde angenommen, dass die Erhöhung von Kohlenhydrat-regulierten Elementen eine Transkriptionskontrolle für die photosynthetischen Gene fungiert. Die Photosynthese wird unter Trockenstress reprimiert, die C- und N-Metabolismen werden aufgrund des Wassermangels und des Fehlens an Nährstoffen gesenkt. N-verknüpfte Glycoproteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellwandbiosynthese als Reaktion auf abiotischen Stress. In der Analyse der einzelnen Genexpressionsprofile wurden keine expliziten Gene der Glycosylierungsprozesse gefunden. Die Identifizierung dieser Gene als eine überrepräsentative Gruppe in der Genanreicherungsanalyse unter Trockenheit ist wahrscheinlich ein Signal dafür, dass in den hier untersuchten Prozessen nicht-annotierte, signifikant differentiell regulierte Gene eine Rolle im Proteinmodifizierungsprozess ausüben. Die Veränderungen sind aber zu schwach, um diese bei den einzelnen Genen erkennen zu können. Als eine Gruppe aber ist das Signal dominant genug, um detektiert zu werden. Die Herabregulierung der Glucosemetabolismen (UDPasen) ist ein weiterer Effekt des trockenheitsbedingten Stresses. Die UDP-glucose pyrophosphorylasen sind Schlüsselenzyme in der Herstellung der UDP-Glukose, ein Bestandteil mehrerer wichtiger Signalkaskaden, unter anderem der Saccharose- und Glucosesynthese [54]. Die Expressionssenkung dieser Gene stimmt mit der Senkung der zellulären Glukosekonzentration in der Pflanze aufgrund des Stresses überein.

Abbildung 3.30 auf Seite 81 stellt das Verhältnis zwischen dem Einfluss der Behandlung und der Zeit über den einzelnen Zeitpunkten dar. Es scheint, dass die Pflanze einen gewissen zirkadianen Rhythmus folgt. Der Abstand zwischen den behandelten Pflanzen und den Kontrollexperimenten wächst mit der Zeit und wird nach 48h wieder geringer. Dies deutet auf eine von zwei Möglichkeiten hin. Die Pflanze überschreitet nach 48h andauerndem Trockenstress ihren Schwellenwert zur Lebensfähigkeit und geht ein. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass die Akklimatisierung erfolgreich bewerkstelligt wurde. Die niedrige Anzahl an differentiell regulierten Genen sowie die erhöhte Expression von Genen mit einem Bezug zu ROS-Elementen lässt eher auf die zweite Option schließen. Für die Bestätigung einer dieser Theorien müssen weitere Akklimatisierungsexperimente mit längeren Beobachtungsperioden durchgeführt werden.

Die Stressreaktion lässt sich schwer in separate einzelne Zeitpunkte unterteilen. Prozesse hängen oft vom Tagesrhythmus ab und werden nur zu bestimmten Zeitpunkten oder spezifischen Entwicklungsstadien gestartet oder beendet. Andere Prozesse werden beim Stressbeginn gestartet und dauern so lange an, wie die Pflanze entweder vom äußeren Reiz bedroht wird, oder sich akklimatisiert hat.

Tabellen 3.22–3.23 bilden die Aufteilung der Gene kategorisch nach der Zeit ab. Es ist deutlich sichtbar, dass mehrere funktionelle Kategorien (z.B. solche, die direkt mit dem Schutz gegen den Stress oder die Beteiligung von ABA an der Stressregulation) zu mehreren Zeitpunkten vorkommen, andere zeigen ein Maximum im mittleren Bereich des Stressverlaufs. Ein interessantes Ergebnis zeigt die Tatsache, dass in der Analyse der zeitlichen Differenzen keine signifikanten Unterschiede zwischen 9h und 24h festgestellt wurden. Ein wahrscheinlicher Grund für dieses Verhalten ist der vorhin erwähnte zirkadiane Rhythmus des Stressverlaufs. Es lässt sich postulieren, dass diese Periode im Stressverlauf einen kritischen Verzweigungspunkt zwischen dem Weg der Akklimatisierung und dem des programmierten Zelltodes bildet. Trockenstressexperimente anderer Labore haben im Vergleich zu dieser Arbeit unterschiedliche Resultate nachgewiesen [357, 148, 256, 44, 359, 173]. Diese Differenzen lassen sich auf Unterschiede im experimentellen Design zurückführen.

Das Alter der Pflanze sowie die Art, Intensität und Dauer des Stresses üben dabei einen erheblichen Einfluss auf die gelieferten Ergebnisse aus. Um genauer verstehen zu können, welche Prozesse während der Stressregulation von Bedeutung sind, welche Metabolismen zu welchem Zeitpunkt eine Rolle spielen oder um ein Gesamtbild der Stressantwort zu bekommen, werden weitere Experimente nötig sein. Dabei spielen sowohl die Funktion eines Gens als auch der zeitliche Ablauf der metabolischen Prozesse, in denen dieses Gen (und den von ihm abhängigen bzw. regulierten Genen) beteiligt ist, eine wichtige Rolle.

4.5 Regulation der UV-Stress-Stressantwort

Die phänotypischen Vorversuche haben gezeigt, dass UV-Stress nur transient ausgeführt werden kann. Langanhaltende Stressaussetzung des Stresses hat in jeder Dosierung unweigerlich zur vollständigen Zerstörung des pflanzlichen Gewebes geführt. Der ausgewählte Vorversuch mit der transienten Stressbehandlung zeigte beim 30minütigen Stress einen ähnlichen Phänotyp wie der des Hitzestresses.

Die detaillierte Genexpressionsanalyse in dieser Arbeit weist eine außergewöhnliche Reaktion auf den Stress auf. Trotz der Unterschiede in der Vorgehensweise zeigt sie eine starke Korrelation im Expressionsverhalten zu den anderen Experimenten, die UV-Stress untersucht haben [148, 321, 320]. Obwohl in dieser Arbeit eine transiente Methodik angewandt wurde, stieg die Anzahl der signifikant deregulierten Gene kontinuierlich weiter (Abb. 3.11). Die relative Stressintensität dagegen sinkt im Laufe der Zeit. Es lässt sich vermuten, dass die Genexpressionsintensität während der Messperiode konstant bleibt. Interessant ist, dass in beiden Diagrammen in Abbildung 3.11 ein ähnliches Verhalten sichtbar wurde. Die Anzahl der Gene steigt bis 6h (AtGenExpress) bzw. 9h (diese Arbeit) und sinkt dann bis 24h wieder. Im letzten Messungszeitpunkt dieser Arbeit nach 48h wurde ein Anstieg in der Anzahl der deregulierten Gene beobachtet. Die Mehrheit dieser Gene wurde herabreguliert (Kohlenhydratmetabolismen sowie Energieprozesse). In der kleineren Gruppe der hochregulierten Gene wurde unter anderem Gene der SAR- und HR-Signalwege akkumuliert. Seneszenz-regulierende Gene weisen eine erhöhte Aktivität auf. Des Weiteren wurde eine Aktivitätserhöhung der Transkriptionsfaktoren identifiziert. Mehrere WRKY (u.a. AT2G46400, AT2G38470), die für ihre Rolle im Pathogenitätsschutz sowie der Seneszenz bekannt sind, wurden hier intensiver exprimiert. Die erhöhte Expression von Genen der NAC-, bZIP- oder MYB-Familien deutet dagegen auf erhöhte transkriptionelle Aktivität hin. Das lässt vermuten, dass die Pflanze weiterhin versucht, den Stress zu bekämpfen. Die Herabsetzung verzichtbarer Metabolismen dient dazu, Energiereserven für die Bekämpfung des Stresses zu sparen.

Über ein Drittel der identifizierten deregulierten Gene in dieser Arbeit konnten bisher funktio-

nell nicht annotiert werden. Darunter sind auch mehrere Transkriptionsfaktoren aus verschiedenen Familien mit unterschiedlichen Expressionsrichtungen. Sowohl die bereits bekannten annotierten Gene, als auch die Akkumulation unterschiedlicher Transkriptionsfamilien mit verschiedenen bekannten und hypothetischen Funktionen deuten auf die notwendige Diversität in der zellulären Reaktion auf UV-Stress hin. Weitere Experimente könnten helfen, die Interaktionen der UV-Reaktion mit anderen umweltbedingten Stressfaktoren zu charakterisieren. Als Beispiel dafür können Experimente mit einer großen Reaktionsähnlichkeit zu UV-Stress, wie die Reaktion auf chemischen Stress oder Experimente mit unterschiedlichen Lichtstressfaktoren, dienen. Die in dieser Arbeit identifizierte, erhöhte Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren deutet auf einen möglichen, bisher unbekanntem UV-Lichtsensor stromaufwärts in dieser Signalkaskade hin, der die Reaktion auf den Stress steuert und so viele Transkriptionsfaktoren bereits im ersten Messungspunkt aktiviert hat. Es wäre von größter Wichtigkeit, mehr über diese Transkriptionsfaktoren zu erfahren, da sie in der Regel Schlüsselpositionen in den Signalkaskaden besetzen und so die Regulation des Stresses steuern. Vor allem diejenigen Transkriptionsfaktoren mit einer UV-spezifischen Aktivität können eine wichtige Wirkung auf den Stress vorweisen. Im Gegensatz zum Phytochrom A-Signalweg [310], wo der Signalrezeptor bereits bekannt ist, wurde ein UV-Photorezeptor zwar vermutet, konnte bisher aber nicht identifiziert werden [149, 320]. In der Analyse der signifikanten Veränderungen auf kategorischer Ebene wurden mehrere verschiedene Transkriptionsfaktoren hoch reguliert. Faktoren mit einer Funktion in der Reaktion auf Stress (DREB2A, ZAT12, WRKY, STZ), Entwicklungsprozesse (MYB- oder NAC-Gene), Lichtsignale (HYH) und weitere Faktoren deuten auf eine mögliche Aktivierung eines transkriptionellen Netzwerkes hin, das von einem solchen Rezeptor induziert werden könnte. Diese Akkumulation verschiedener Faktoren dient als Indiz für die Komplexität der UV-Stressantwort. Die GSEA-Analyse zeigt eine zweiphasige Antwort auf den Stress, wobei diese Transkriptionsfaktoren während des kompletten Prozessverlaufs eine wichtige Funktion für deren Regulation innehaben. Die UV-Signalwege richten sich auf zwei unterschiedliche Ziele. UV-Licht verrichtet Schäden nicht nur auf DNA-Ebene an, indem es Dimerbrücken produziert [32] und Strandbrüche verursacht [320], sondern führt ebenfalls zur fehlerhaften Transkription und somit direkt oder indirekt zur inkorrekten Proteinfaltung. Aus diesem Grund werden DNA-Reparaturmechanismen aktiviert und Prozesse zur Beseitigung der falsch-gefalteten Proteine intensiver betrieben (WRKY-kontrollierte Prozesse). Da die Pflanze sich gegen den entstehenden abiotischen Stress schützen muss, wurden mehrere entsprechende Schutzmaßnahmen aktiviert. Die Erhöhung des oxidativen Stresses führt zu einer Konzentrationszunahme der zellulären ROS-Elemente. Superoxide und Wasserstoffperoxid-Moleküle dienen einerseits als interzelluläre Signalboten, andererseits verursachen sie in zu hohen Konzentrationen zelluläre Schäden und müssen deshalb abgebaut werden. Dies erklärt zum einen die Intensivierung der Entgiftungs- und Seneszenzprozesse, zum anderem aber auch die überrepräsentative Identifizierung von Prozessen, die von Jasmonsäure bzw. Salizylsäure reguliert werden.

Die Aktivierung der Phenylpropanoid-Signalübertragungswege und insbesondere deren Herstellung ist ein weiteres Signal, dass die Pflanze sich gegen den Stress zu schützen versucht. Flavonoide und andere Phenylpropanoidverbindungen sind bekannt für ihre antioxidative Funktion. Zusammen mit weiteren Prozessen wie z.B. der Alkaloidbiosynthese schützen sie die Pflanze vor UV-Licht [134]. Wider Erwarten wurde keine signifikante erhöhte Aktivität der Carotinoide, einer weiteren Gruppe antioxidativer Moleküle beobachtet. Sie wurden sogar gegen Ende der Messungsperiode herabreguliert. Eine mögliche Erklärung dafür wären unterschiedliche Aktivierungsmethoden für die beiden Antioxidanten-Gruppen, die vielleicht auf unterschiedliche Arten von oxidativem Stress reagieren. Es ist andererseits möglich, dass diese Prozesse herabreguliert wurden, um Energie für die Stressbe-

kämpfung einzusparen. Eine dritte Erklärung für die Senkung gerade in den späteren Zeitpunkten ist das Vorhandensein ausreichender Konzentration dieser Moleküle in der Zelle.

Die Expressionserhöhung der Schlüsselgene der Lichtreaktion (HYH, ELIP usw.) geht mit dem Versuch einher, die DNA zu reparieren [321]. Gene zum Schutz vor photooxidativen Schäden sowie zur Aufrechterhaltung der photosynthetischen Aktivität und deren Prozesse wurden hier aktiviert (Tab. 3.26). HYH ist ein HY5-homolog, ein bZIP-Transkriptionsfaktor mit einer Schlüsselrolle in verschiedenen Wachstumsprozessen, insbesondere bei der Transition von der Vergeilung (Etiollement) zur Photomorphogenese. Er spielt ebenfalls eine wichtige Rolle beim Phytochromsignalweg. Die frühe Erhöhung dessen Expression ist ein Zeichen für den Versuch der Pflanzen, Schutzmechanismen gegen den Stress in Gang zu setzen. Diese Gene sind für das Überleben der Pflanzen unter Stress von immenser Wichtigkeit. Die Tatsache, dass HYH differentiell reguliert wurde, HY5 dagegen nicht, könnte darauf hindeuten, dass diese beiden Gene unterschiedlichen, bisher unbekanntem Aktivierungsmechanismen unterstehen. Der genaue Ablauf dieser Reaktion und die Art, wie diese sehr ähnlichen Faktoren in separater Weise zu untersuchen werden, müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

Einer der Effekte des UV-Stresses ist die Transkriptionsreduktion der Gene des photosynthetischen Apparates. Von der ersten Messung an konnte hier sowohl die Aktivitätssenkung dieser Prozesse als auch die Herabregulierung der Gene verantwortlich für die Strukturen dieser zellulären Komponente beobachtet werden. Proteine der Lichtreaktion, der Chlorophyllbiosynthese, der beiden Photosysteme sowie der Thylakoidstrukturen wurden hier fast ausnahmslos reprimiert (Abb. 3.36, Tab. 3.25-3.26). Hector et al. [106] konnten zeigen, dass ein niedriger UV-Level eine erhöhte Expression der Chlorophyllbiosynthesegene hervorruft. Protochlorophyllide Reductase A bzw. B wurden unter schwachem UV-Licht hochreguliert, während deren Expression in dieser Arbeit gesunken ist. Es scheint, dass die Reduktion der Chlorophyllbiosynthese (und vermutlich auch weiterer Photosyntheseelemente) von der Lichtkonzentration abhängt. Die Erhöhung der Chlorophyllbiosynthesegene kommt bei Akklimatisierungsprozessen vor. Dagegen wurden diese Gene bei einer stärkeren Stressintensität herabreguliert. Es ist auch möglich, dass die Entscheidung, diese Gene hoch- oder herabzuregulieren, von weiteren Faktoren abhängt. Eines dieser Signalmoleküle könnten die ROS-Elemente sein. Katalasen, Ascorbatperoxidasen/-oxidasen sowie Glutathionoxidasen/-peroxidasen, die unter bestimmten Stresssituationen herabreguliert wurden [106], weisen hier eine zum Teil sehr starke Expressionsintensivierung auf.

UV-B Licht ausgesetzte Pflanzen zeigen häufig einen veränderten Phytohormonmetabolismus, der zu viel kleineren Pflanzen als normal führt. Ähnliche Phänotypen wurden bei Pflanzen mit Störungen im Brassinosteroidsignalübertragungsweg beobachtet [79]. Solche Pflanzen weisen eine reduzierte Expression der UV-B Markergene auf. Ein weiteres Phytohormon mit einem geschwächten Metabolismus ist Auxin. Diese Hormonfamilie ist ebenfalls für das Pflanzenwachstum zuständig. Die auffallend große Menge an herabregulierten Genen bietet eine weitere Erklärung für den Zwerg-Phänotyp. Die Deregulation der Phytohormongene weist im Durchschnitt in dieser Arbeit keine sehr großen Veränderungen auf. Es wurde aber bereits in früheren Experimenten nachgewiesen, dass auch kleinere Schwankungen im Phytohormonmetabolismus einen deutlichen biologischen Effekt nach sich ziehen [106]. Die Tatsache, dass hier nicht alle Gene des Auxinmetabolismus herabreguliert, manche sogar stark hoch reguliert (AT2G26440 - 20fach, AT1G76650 - 19fach usw.) wurden, deutet auf die Komplexität der pflanzlichen Auxinantwort auf abiotischen Stress hin. Ähnlich wie in Abbildung 3.19 dargestellt wurde, übt Auxin (sowie andere Phytohormone) mehrere Rollen aus, die direkt oder indirekt mit dem Wachstum zu tun haben. Diese Fluktuationen in den Expressionsintensitäten sowie die

Identifizierung der stressspezifischen deregulierten Gene für jeden dieser Stressfaktoren verstärkt die Annahme, dass die Phytohormone entweder unterschiedliche Funktionen bei verschiedenen Stressfaktoren besitzen, oder dass sie dort von unterschiedlichen Faktoren reguliert werden.

Wie aus den Resultaten dieser Arbeit ersichtlich ist, wurde die strukturelle Integrität der Zelle aufgrund des Stresses gestört. Es wurden mehrere Gene der intra- bzw. interzellulären Strukturen herabreguliert (PSI,-II, Mikrotubuli und das Zytoskelett usw.). Schlüsselgene für die strukturelle Integrität der Zellwand wurden hier herabreguliert. Das Zusammenspiel von herabregulierenden Phytohormonen, von der Schwächung der strukturellen Integrität und dem Stress funktioniert als Regulator des Pflanzenwachstums. Die Zellwand spielt eine wichtige Rolle bei der Ausführung phytohormonbedingter Zellwachstumsprozesse. UV-Licht absorbierende Verbindungen sind kovalent an der Zellwand gebunden [261]. Auxin stimuliert das Wachstum, indem es die Zellen anregt, ihre extrazellulären Räume anzusäuern. Dadurch werden sie elastischer. Expansine wurden als Katalysatoren für diesen Prozess identifiziert [55]. Gene der Expansin-Familie wurden hier als Reaktion auf den Stress herabreguliert (Expansin A1 - 3.5fach, A5 - 12.5fach, A3 - 14.3fach, EXLA 3.3fach, XTH -5.5 fach). Die Familie der Lignine beinhaltet Makromoleküle, welche die Verholzung der Zellwand bewirken. Dies verleiht der Zelle die nötige Stabilität. Die Reduktion der zellulären Strukturintegrität geht mit der Senkung der Ligninmenge in der sekundären Zellwand sowie der Familie der Expansine einher. Die Expressionssenkung der Schlüsselgene des zellulären Wachstums zusammen mit dem Stress führt mit größter Wahrscheinlichkeit zu einer geänderten Zellmorphogenese in der Pflanze.

Die Pflanzenreaktion auf UV-Stress variiert, abhängig von vielen Faktoren, stark. Die Pflanzenart, die Intensität des UV-Lichtes, die Dauer der Behandlung (transient, chronisch oder akut) bzw. die Stärke und weitere umweltbedingte Parameter können diese Reaktion beeinflussen. Diese Komplexität wird dadurch sichtbar, dass verschiedene Experimente mit unterschiedlichen Grundbedingungen nicht das gleiche Expressionsprofil aufweisen. Gene für den Carotenoidmetabolismus werden bei einer Untersuchung mit schwachem UV-Licht herabreguliert [106], während in dieser Arbeit wenige Gene dieser Signalkaskade, bei einer höheren Stressintensität hochreguliert wurden (z.B. Photosynthase oder Carotenhydroxylase). Diese haben aber vermutlich mehr mit der Reaktion auf Lichtstress zu tun als direkt mit der antioxidativen Funktion der Carotinoiden-Familie. MEB5.2, ein UV-Markergen, wurde ähnlich wie in dieser Arbeit in einem früheren Experiment unter einer 15minütigen Stressperiode hochreguliert [321]. Dagegen wurde in einer anderen Untersuchung keine differentielle Deregulation beobachtet. HY5, ein bZIP-Transkriptionsfaktor und Schlüsselgen der Photomorphogenese, wurde bei früheren UV-induzierten Experimenten hochreguliert (15 Minuten Stressdauer [320] oder vier bzw. sechs Stunden Behandlung von drei Wochen alten Pflanzen [42]). In dieser Arbeit weist HY5 keine differentielle Expression auf. Dasselbe gilt auch für UVR8, ein Chromatingen mit einer Schlüsselfunktion in der UV-Resistenz [69, 106], für verschiedene Gene des Ethylenmetabolismus (z.B. ACC-Synthase, ACC-Oxidase) und für weitere Gene, die in den regulatorischen Mechanismen der pflanzlichen Stressantwort mitwirken. Akuter UV-Stress zeigt im Vergleich zum chronischen Stress ein anderes Expressionsverhalten. Diese Unterschiede in den verschiedenen Experimenten zeigen, wie viel über die Stressantwort noch nicht bekannt ist. Ein wichtiger Faktor bei den weiteren Analysen, um die Zusammenhänge in den verschiedenen Reaktionen zu entziffern, ist die Stabilität. Es scheint, dass die Grundbedingungen einen starken Einfluss auf die Reaktion haben. Um die Erkenntnisse über den Stress bzw. die Stressantwort zu vervollständigen, müssen diese 'Bedingungen konstant gehalten werden.

Diese Komplexität ist nicht nur UV-Stress spezifisch. Solche widersprüchlichen Ergebnisse wurden ebenfalls für Hitze und den trockenheitsbedingten Stress gefunden. Diese Arbeit stellt den bisher

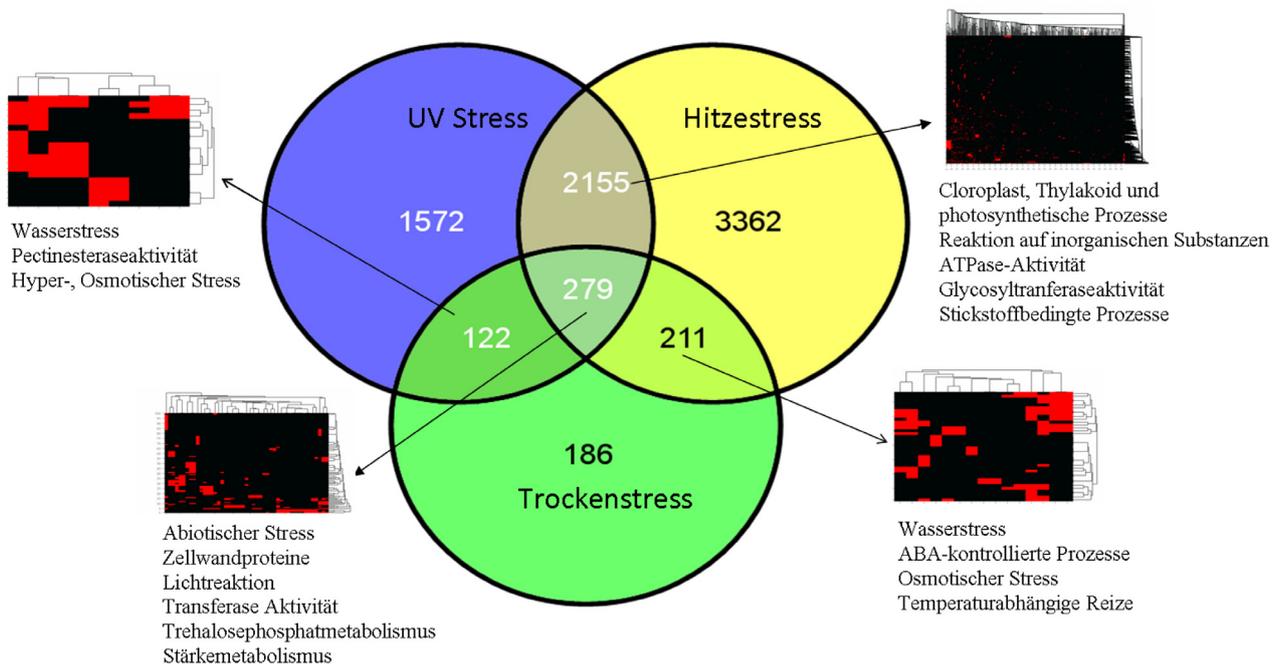


Abbildung 4.7: Gemeinsame deregulierte Gene unter Hitze-, Trockenheits- und UV-B-Stressfaktoren. Deregulierte Gengruppen aller drei Stressfaktoren wurden verglichen. Die Gruppen mit Genen in mehr als einem einzigen Stress wurden weiterhin auf Anreicherung der funktionellen Kategorien untersucht. Die für alle drei Faktoren gemeinsame Gruppe ist im Vergleich zur Gesamtheit relativ klein, beinhaltet aber Transkriptionsfaktoren mit einer Schlüsselrolle in der pflanzliche Stressantwort.

ersten Vergleich unterschiedlicher Stressfaktoren basierend auf dem gleichen Stresslevel (und einem ähnlichen Phänotyp) dar. Durch diese Arbeit sollte insbesondere geklärt werden, wie der Stress reguliert wird, welche Gene bei welchem Stressfaktor hoch- oder herabreguliert werden oder wie ähnlich bzw. unterschiedlich die Pflanze auf die verschiedenen Faktoren reagiert. In Abb. 4.7 wurden die Gruppen der differentiell regulierten Gene der drei in dieser Arbeit untersuchten Stressfaktoren verglichen. Für jede der vier gemeinsamen Subgruppen wurden die Gene auf überrepräsentative funktionelle Annotationen untersucht. Mit einem solchem Vergleich ist es möglich, zusammenhängende Prozesse sowie Differenzen in der Stressreaktion zu identifizieren. Die roten Bereiche in den jeweiligen Heatmaps stellen gemeinsame Gengruppen überrepräsentativer GO-Kategorien dar. Die für alle drei Stressfaktoren gemeinsame Gengruppe beinhaltet zwar vergleichsweise wenig Gene, dafür aber auch einige bekannte (RAV1, ERF8 oder HB7). Darüber hinaus wurden hier Transkriptionsfaktoren mit einer unbekanntem Funktion identifiziert (z.B. BZO2H2 oder 3, bHLH64, NACOB). Diese Faktoren regulieren die Stressantwort in allen drei Stressfaktoren. Es ist noch nicht klar, ob dies in allen drei Stressfaktoren auf dieselbe Art ausgeführt wird. Die Tatsache, dass dieselben funktionellen Annotationen in den Subgruppierungen mit nur zwei Stressfaktoren (Hitze und Trockenheit und UV und Trockenheit) ähnlich überrepräsentativ angereichert wurden, stützt die Hypothese, dass die allgemeine und die stressspezifische Antwort sehr komplex aufgebaut ist. Manche Prozesse können von bestimmten Genen unter einem spezifischen Zustand kontrolliert werden. Dagegen werden diese Prozesse unter einem anderen Stressfaktor von anderen Faktoren reguliert.

In der gemeinsamen Gruppe wurden mehrere temperaturabhängige Gene beobachtet (u.a. COR15a, -b, RD29A, ERD10, WAK1). Diese Gene sind bereits bekannt für ihre Rolle unter Kältestress bzw. Salzstress. Diese Faktoren regulieren mehrere Signalübertragungswege, und kontrollieren mehre-

re Verzweigungspunkte, wodurch die Signalkaskade aufgefächert wird. In dieser Arbeit wurde ein neues Protokoll beschrieben und getestet, um mehrere abiotische Stressfaktoren auf der Gen- sowie funktionellen Ebene zu analysieren. Als Ziel wurde gesetzt, ein Stresskompendium der Genexpressionsprofile zu erstellen. Dabei soll festgestellt werden, inwieweit sich die pflanzliche Reaktion auf verschiedene Faktoren überlappt bzw. unterscheidet. Bereits bekannte Erkenntnisse konnten hier bestätigt werden. Andere Resultate widersprechen früheren Ergebnissen. Dies dient als eine Bestätigung für die Komplexität der Stressantwort und wie die Grundbedingungen die herausgefundenen Resultate beeinflussen. Diese entgegenstehenden Fakten sprechen für unsere Wahl der Analyse basierend auf einem ähnlichen Stresslevel. In dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse gewonnen, wie z.B. die Gruppe der TFBS-Domäne, für die ein hitzestressspezifisches Verhalten identifiziert wurde, die De-regulation der Phytohormone Auxine und Gibbereline und die Regulation der Ribosomenbiosynthese sowie die Histone durch Hitze, um nur einige zu nennen.

Es bleiben trotz der hinzugewonnen Erkenntnisse noch viele Fragen offen. Hierzu zählen der Grund für die Herabregulierung des Stärkemetabolismus unter Hitze oder wie die Pflanzen die Stressart erkennen, wenn sie in den unterschiedlichen Signalkaskaden gemeinsame Gene haben. Ein wichtiger Faktor wäre festzustellen, ob ein solcher spezifischer Stressrezeptor existiert, der die Signale auf unterschiedliche Weise weiterleitet. Zur Beantwortung dieser Fragen bedarf es weiteren Experimenten. Die Kombination der ausführlicheren Experimente mit weiteren physiologischen und quantitativen Analysen, könnte in der Zukunft weiterhin dazu beitragen, die Fragen nach dem pflanzlichen Verhalten unter unterschiedlichen abiotischen Stressfaktoren zu beantworten.

Kapitel 5

Ausblick

Das vollständige Genom der *A. thaliana* steht bereits seit einigen Jahren der Forschung zur Verfügung. Mit Hilfe der genomischen Information ist es möglich geworden, high-throughput Analysen des kompletten Genoms durchzuführen. Das Ziel dieser neuen Richtung, der „funktionellen Genomik“ war, die biologischen Funktionen der Gene und deren Produkte zu definieren [114]. Es sollte nicht nur eine Art Katalog entstehen, sondern man wollte versuchen, die Beziehungen zwischen diesen Genen zu verstehen. Einer dieser Hochdurchsatzmethoden basiert auf Microarrays für die globale Genexpressionsanalyse. Bei dieser Vorgehensweise wird eine Quantifizierung der hybridisierten Proben auf RNA-Level durchgeführt. Dies erlaubt die gleichzeitige Analyse Tausender Gene bzw. Proben im Genom. Die RNA- bzw. Oligonukleotid-Microarrays werden seit über 15 Jahren in der Pflanzenforschung intensiv benutzt, um deren Transkriptome zu erforschen [270, 184].

Einen sehr wichtigen Aspekt der Pflanzenforschung stellt die Analyse der pflanzlichen Reaktion auf abiotische Stressfaktoren dar. Dieses Thema wird in den kommenden Jahren aufgrund der klimatischen Veränderungen immer akuter. 2003 hat eine Hitzewelle europaweit den Ernteertrag der Nutzpflanzen um 30% reduziert [53]. Die Information über das komplette Genom gibt uns die Möglichkeit, alle metabolischen Signalkaskaden auf einem Blick zu untersuchen. Es hat sich aber auch gezeigt, dass die Microarray-Technologie nicht alle Fragen zum Stress und zur Stressreaktion beantworten kann. Zumal bereits bekannt ist, wie komplex und umfangreich die tatsächliche Stressantwort wirklich verläuft, und dass nicht nur die eigentlichen Gene in diesen Signalkaskaden eine Funktion bei deren Regulation ausüben. Die Entdeckung der kleinen funktionellen RNA-Moleküle wie microRNA [104], small interference RNA (siRNA, [344]), lincRNA [249] oder PASR/TSAR (Promotor-/Terminator-associated small RNA [56]) bietet eine Erweiterung für die regulatorische Stressantwort und steigert die Komplexität dieser pflanzlichen Mechanismen [300]. In den letzten Jahren wurde die Fülle der Hochdurchsatz-Technologien um eine weitere Möglichkeit erweitert. Die sog. „Next-Generation Sequencing“ (NGS) [204, 285]. Dieses neue Plattform beinhaltet verschiedene experimentelle Richtungen für unterschiedliche Fragestellungen. Die NGS-Daten können in der Transkriptomanalyse, der Protein-DNA Interaktionen oder auch für die Analyse der Genomvariationen benutzt werden. Im Vergleich zu den Microarray-Technologien werden den NGS-Plattformen verschiedene Vorteile zugeschrieben. Die Microarrays, so wie wir sie heute kennen, werden wegen deren Aufbau und zum Teil starken Hintergrundrauschen und Cross-Hybridisierungen an Effektivität verlieren. Aufgrund dessen ist es für Microarrayexperimente schwieriger, schwache Veränderungen zu bestimmen. In dieser Arbeit konnte für den trockenheitsbedingten Stress vergleichsweise weniger deregulierte Gene identifiziert werden. Anhand des phänotypischen Vorversuche kann davon ausgegangen werden, dass die Stressintensität gleich hoch war. Ein möglicher Grund für diese niedrige Anzahl an

differentiell regulierten Genen lässt sich auf diesen Nachteil zurückführen. Vielleicht würden keine weitere Gene unter Trockenheit identifiziert, da deren Intensität zu schwach war, um diese mit einem Microarray-basierten Experiment herauszufinden. Die Identifizierung mehrerer metabolischer Veränderungen mittels der GSEA-Analyse, die nicht nur die einzelnen Intensitäten betrachtet, sondern auf kategorischer Ebene wirkt und Gene mit ähnlichen Gengruppen sucht, unterstützt diese Annahme. Weiterhin können mittels Arrays lediglich diejenige Transkripte untersucht werden, die auf dem Array fixiert wurden. RNA-Seq Analysen sind nicht darauf limitiert [333, 193]. Die RNA-Seq Methode erweitert die Analyse auf das komplette Genom, wobei auch unbekannte Sequenzen charakterisiert und quantitativ bestimmt werden können. Aufgrund der Tatsache, dass die NGS-Analysen bis zum einzelnen Nukleotid vordringen können, wäre es viel leichter, neue Gene zu annotieren, funktionelle Sequenzbereiche zu definieren und SNPs zu entdecken. Dies war mit den Microarrays bisher nicht möglich.

Trotz der vielen Vorteile der neuen NGS-Technologien ist der Weg zum vollständig annotierten Genom noch weit. Die größten Schwierigkeiten dieser Methoden stellen die immensen Kosten und das aufwendige Datenmanagement dar. Während die Kosten in den letzten Jahren kontinuierlich sinken, bleibt die tatsächliche Analyse immer noch sehr umfangreich und komplex. Die sehr hohe Sensitivität der NGS-Analyse führt zu sehr großen Datenmengen. Diese massiven Dateien benötigen spezielle bioinformatische Tools, um hieraus sinnvolle Ergebnisse herausfinden zu können. Verfügbare Downstream-Software Tools für die Analyse dieser Daten stellen momentan den Engpass im Workflow der NGS-Datenverarbeitung dar. Da die NGS-Technologien sich auf das korrekte Mapping der kleineren Sequenzbruchstücke an die richtige Position fokussieren, muss diese Aufgabe mit großer Vorsicht ausgeführt werden. Die bisher existierenden Differenzen in den vorhandenen Technologien (bei der Vorbereitung der Proben, den involvierten chemischen Prozessen der PCR, der Sequenzierung und der Identifizierung, den Rohdatenformaten usw.) erschweren das Erstellen eines Standardprogramms oder Workflows für die Automatisierung dieses Prozesses. Wie bei den Microarrays fehlt es immer noch an Normalisierungsalgorithmen, um aus diesen Rohdaten einen quantitativen Expressionswert abzuleiten. Wegen dieser extrem hohen Anfälligkeit der RNA-Seq-Daten benötigen diese Protokolle eine sehr genaue Qualitätskontrolle.

Dieser Technologienzweig entwickelt sich in rasanter Geschwindigkeit. Es werden immer wieder neue Sequenzieretechnologien auf den Markt gebracht, die schneller, effizienter und kostengünstiger arbeiten können. Die Anzahl an bioinformatischen Tools für jeden der möglichen Bereiche in der NGS-Welt steigt täglich an¹. Mit Hilfe dieser Technologien wird es in der Zukunft wahrscheinlicher sein, nicht nur das komplette Genom der *A. thaliana* zu sequenzieren, sondern auch die Interaktionen im Transkriptom als Reaktion auf den abiotischen Stressantwort zu entdecken und deren Kinetik und Reaktionspartner zu definieren. Die NGS-Methoden werden es ermöglichen, weitere Teilnehmer an der abiotischen Stressantwort zu bestimmen und so den Verlauf der Stressantwort zu vervollständigen.

Eine weitere Problematik, die nicht zu unterschätzen ist, liegt in der Diskrepanz zwischen den Experimenten im Labor und den Bedingungen auf dem Feld. Damit der Ernteertrag erhöht werden kann, müssen Stresskombinationen untersucht werden. Dieser Unterschied in den experimentellen und realen Grundbedingungen kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse verfälschen. Während im Labor die Pflanzen unter konstanten Bedingungen und sehr oft zu kurzen Stressperioden gehalten werden, begegnen sie in der Natur meist einer Kombination von mehreren Stressfaktoren. Frühere Experimente konnten bereits zeigen, dass die pflanzliche Reaktion auf einzelnen Stressfaktoren sich von der Kombination derselben Stressfaktoren unterscheidet [167, 213]. Hinzu kommt, dass

¹<http://seqanswers.com/wiki/software>

sogar verschiedene Zelltypen ein unterschiedliches Expressionsprofil für einen einzigen Stressfaktor vorweisen können. Die molekularen Mechanismen, die für dieses unterschiedlichen Verhalten verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht identifiziert werden [112]. Die Verbesserung der Pflanze für einen Faktor wird aus diesem Grund nicht unbedingt den erwarteten Effekt erzielen, wenn auf dem Feld getestet wird. Um diese Probleme zu überwinden, muss erst mehr über dieses komplette „Stressreaktion-System“ in Erfahrung gebracht werden. Trotzdem stehen wir vor größeren Herausforderungen. Identifizierung von Stresssensoren des abiotischen Stresses muss bewerkstelligt werden. Die Ermittlung der Schlüsselgene, die als Verbindungsstück zwischen den abiotischen Faktoren und den distal liegenden und von denen regulierten Entwicklungs- und Wachstumsprozessen stellt einen bedeutenden Schritt in dieser Richtung dar. Ein wichtiger Faktor für zukünftige Analyse ist die Erstellung naturgetreuerer experimentellen Bedingungen, um Langzeitstressperioden von multiplen Stressfaktoren analysieren zu können.

Abkürzungen

β -ME	β -Mercaptoethanol	MAPK	MAP kinase
ABA	Abscisinsäure	MAS5	MicroArray Suite Version 5
ACC	Acetyl-Coenzym A Carboxylase	MeJa	Methyljasmonat
AGE	AtGenExpress	MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
AREB	ABA-responsive element binding protein	MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
ATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mM	Millimolar (Konzentrationsangabe)
ATP	Adenosine-5'-triphosphate	NaCl	Natrium Chlorid
ATTPA	trehalose-6-phosphate phosphatase	NH ₄ OH	Ammonium hydroxide (ammonia water)
bHLH	Basic Helix Loop Helix	PCA	Principal component analysis
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	PCD	programmed cell death
BRH	Brassinosteroid-responsive	PE tubes	Polyethylene Röhrchen
bZIP	Basic Leucine Zipper Domain	PEG 8000	Polyethylene Glykol 8000
CBF	C-repeat DER binding factor	PQ	Paraquatdichlorid hydrat
cDNA	copyDNA	PR	Pathogenesis-related
CIPK	CBL-interacting protein kinases	PS I/II	Photosystem I/II
COR	cold regulated	QC	quality control
cRNA	copyRNA	RAV	Related to ABI3/VP1
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	RD	Responsive to Dessication
Wasser			
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RMA	Robust Microarray Averages
dNTP	Deoxynucleoside triphosphatase	RNA	Ribonucleic acid
DRE	Dehydration Responsive Element	ROS	reactive oxygen species
DREB	DRE/CRT binding protein	RT	reverse transcripase
DTT	1,4-Dithiothreitol	RT-PCR	RT-polymerase chain reaction
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	SA	Salicyl acid
ELIP	early light-induced protein	SAGE	serial analysis of gene expression
ERD	Early-responsive to dehydration	SAPE	Streptavidin R-Phycoerythrin
FDR	False discovery rate	SAR	Systemic Acquired Resistance
GA	Gibberellic acid	SAUR	small auxin up RNA
GCOS	GeneChip Operating system	SMA	Spectral map analysis
gRNA	gesamt RNA	SSPE	Saline sodium phosphate buffer
GSEA	Gene Set enrichment analysis	TAE	Tris-Acetat-EDTA
GTP	guanosine triphosphate	TAF	TBP-associated factors
ha	Hektar	tBHP	tert-butylhydroperoxide
HAT	Histon-Acetyltransferase	TBP	TATA-Box-binding protein
HDAC	Histon-Deacetylase	TCA	Tricarbon acid
HL	High light (Lichtstress)	TE	Tris EDTA
HR	Hypersensitivity Reaction	TFBS	Transkriptionsfaktorbindestellen
HS	Hitzeshock / Hitzestress	TIR	Toll/interleukin-1 receptor
IAA	Indole-3-acetic acid	UDP	Uridindiphosphat
IVT	in-vitro transcription	UDPG	UDP Glycosyltransferase
JA	Jasmonic acid	UGPase	UDP-glucose pyrophosphorylase
LEA	late embryogenesis abundant	UV	Ultraviolett
LRR	Leucine Rich Repeats	ZAT	Zinc transporter of <i>Arabidopsis thaliana</i>
LTI	low-temperature-induced		

Literaturverzeichnis

- [1] **Abbasi, F. et al.** OsCDPK13, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath. *Plant Mol Biol*, **55**:541–552, **2004**.
- [2] **Abe, M. et al.** Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J.*, **26(5)**:487–494, **2001**.
- [3] **Affymetrix Inc.** *Affymetrix Microarray Suite User Guide*. Santa Clara, CA USA, **1999**. 4. Edition.
- [4] **Affymetrix Inc.** *GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array*, **2004**.
- [5] **Affymetrix Inc.** *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*. Santa Clara, CA USA, **2005**. P/N 702232 Rev. 2.
- [6] **Almansouri, M., Kinet, J.M. & Lutts, S.** Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*triticum durum* desf.). *Plant and Soil*, **231**:234–254, **2001**.
- [7] **Alter, O. et al.** Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:10101–10106, **2000**.
- [8] **Ancian, P. et al.** Impact of RNA degradation on Affymetrix gene expression profiles. *Toxicology Letters*, **172(1)**:S37, **2007**.
- [9] **Apel, K. & Hirt, H.** REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol*, **55**:373–399, **2004**.
- [10] **Apweiler, R. et al.** The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res*, **29(1)**:37–40, **2001**.
- [11] **Ariadne genomics.** Pathway Studio pathway analysis software. Ariadne Genomics, **2008**.
- [12] **Asada, K.** *Radical Production and Scavenging in the Chloroplasts*. Springer Verlag, 5 edition, **2004**. Photosynthesis and the Environment: Advances in Photosynthesis and Respiration.
- [13] **Asada, K. & Takahashi, M.** *Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis*. Elsevier, Amsterdam, **1987**. In *Photoinhibition* (Kyle, D.J. et al., eds), pp 227–287.
- [14] **Ascenzi & Gantt, J.S.** Molecular genetic analysis of the drought-inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **41**:159–169, **1999**.
- [15] **Ascenzi, R. & Gantt, J.S.** Subnuclear Distribution of the Entire Complement of Linker Histones in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, **108**:345–355, **1999**.

- [16] **Ascenzi, R. & Gantt, J.S.** A drought-stress-inducible histone gene in *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol. Biol.*, pages 629–642, **2004**.
- [17] **Babbs, C.F. et al.** Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiology*, **90(4)**:1267–1270, **1989**.
- [18] **Baena-González, E. et al.** A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, **448(23)**:938–943, **2007**.
- [19] **Bakay, M. et al.** Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics*, **3**:4, **2002**.
- [20] **Baker, S.S. et al.** The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.*, **24(5)**:701–713, **1994**.
- [21] **Balázi, G. & Oltavi, Z.N.** Sensing your surroundings: how transcription-regulatory networks of the cell discern environmental signals. *Sci. STKE*, **282**:pe20, **2005**.
- [22] **Baniwal, S.K. et al.** Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.*, **29(4)**:471–487, **2004**.
- [23] **Bao, F. et al.** Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **134**:1624–1631, **2004**.
- [24] **Bao, X. et al.** Repression of AGAMOUS by BELLRINGER in floral and Inflorescence Meristems. *Plant Cell*, **16**:1478–1489, **2004**.
- [25] **Barrero, J.M. et al.** Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, **29(10)**:2000–2008, **2006**.
- [26] **Benjamini, Y. & Hochberg, Y.** Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B*, **57**:289–300, **1995**.
- [27] **Benjamini, Y. & Yekutieli, D.** The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. statist.*, **29(4)**:1165–1188, **2001**.
- [28] **Bienz, M. & Pelham, H.R.B.** Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv Genet.*, **24**:31–72, **1987**.
- [29] **Bilban, M. et al.** Defining signal thresholds in DNA microarrays: exemplary application for invasive cancer. *BMC Genomics*, **3**:19, **2002**.
- [30] **Bleasby, A.** the FUZZNUC program. Emboss, **2000**.
- [31] **Bleuler, S. & Zitzler, E.** Order preserving clustering over multiple time course experiments. *Lecture Notes in Computer Science*, **3449**:33–43, **2005**.
- [32] **Bockrath, R. et al.** Specificity of mutaton by UV light and delayed photoreversal in umuC-defective *Escherichia coli* K-12: a targeting at pyrimidine dimers. *J. Bacteriol.*, **169(4)**:1410–1416, **1987**.

- [33] **Bonetta, D. & McCourt, P.** Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci.*, **3(6)**:231–235, **1998**.
- [34] **Booij-James, I.S. et al.** Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiol.*, **124(3)**:1275–1284, **2000**.
- [35] **Borevitz, J.O. et al.** Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell*, **12**:2383–2394, **2008**.
- [36] **Boyer, J.S.** Plant Productivity and Environment. *Science*, **218(4571)**:443–448, **1982**.
- [37] **Bray, E.A.** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, **103**:1035–1040, **1993**.
- [38] **Bray, E.A.** Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot.*, **89**:803–811, **2002**.
- [39] **Bray, E.A. et al.** *Responses to abiotic Stresses*. Responses to abiotic Stresses. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, **2000**. W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones, Editors., Kapitel 22, 1158-1249.
- [40] **Brewer, J.W. & Diehl, J.A.** PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:12625–12630, **2000**.
- [41] **Brosche, M. et al.** Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol. Plant*, **117(1)**:1–10, **2003**.
- [42] **Brown, A. et al.** A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102(50)**:18225–18230, **2005**.
- [43] **Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R.** *Biochemistry & Molecular Biology of the Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, USA, **2000**. Kapitel 22, pp. 1158-1203.
- [44] **Catala, R. et al.** The *Arabidopsis* E3 SUMO Ligase SIZ1 Regulates Plant Growth and Drought Responses. *Plant Cell*, **19(9)**:2952–2966, **2007**.
- [45] **Catinot, J. et al.** Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, **582(4)**:473–478, **2008**.
- [46] **Ceusters, J. et al.** Drought adaptation in plants with crassulacean acid metabolism involves the flexible use of different storage carbohydrate pools. *Plant Signal Behav.*, **4(3)**:212–214, **2009**.
- [47] **Chandrasekharan, M.B. et al.** Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J.*, **33(5)**:853–866, **2003**.
- [48] **Chaubet, N. et al.** Identification of cis-elements regulating the expression of an *Arabidopsis* histone H4 gene. *Plant J.*, **10**:425–435, **1996**.
- [49] **Chen, J.J. et al.** Reproducibility of microarray data: a further analysis of microarray quality control (MAQC) data. *BMC Bioinformatics*, **8**:412, **2007**.

- [50] **Cheng, Y. et al.** AtCAND1, A HEAT-Repeat Protein That Participates in Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, **3(6)**:231–235, **1998**.
- [51] **Cheong, Y.H. et al.** Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **129(2)**:661–677, **2002**.
- [52] **Chinnunsamy, V.K. et al.** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *J. Exp. Bot.*, **55**:225–236, **2004**.
- [53] **Ciais, P.H. et al.** Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, **437**:529–533, **2005**.
- [54] **Ciereszko, I. et al.** Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem. J.*, **354**:67–72, **2001**.
- [55] **Cosgrove, D.J.** Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.*, **118**:333–339, **1998**.
- [56] **Costa, V. et al.** Uncovering the complexity of transcriptomes with rna-seq. *J Biomed Biotechnol.*, **2010**. doi:10.1155/2010/853916.
- [57] **Creelman, R.A. & Mullet, J.E.** Water deficit modulates gene expression in growing zones of soybean seedlings. analysis of differentially expressed cDNAs, a new beta-tubulin gene, and expression of genes encoding cell wall proteins. *Plant Mol Biol.*, **17(4)**:591–608, **1991**.
- [58] **Cutler, S. et al.** A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science*, **273**:1239–1241, **1996**.
- [59] **da Silveira, J.A.G et al.** Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *BRADYRHIZOBIUM SPP.* under moderate nitrate level. *Braz. J. Microbiol.*, **32(3)**:187–194, **2001**.
- [60] **Dalal, M. et al.** Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *Journal of Biotechnology*, **139(2)**:137–145, **2009**.
- [61] **Dalessandro, G.** Interaction of auxin, cytokinin, and gibberellin on cell division and xylem differentiation in cultured explants of jerusalem artichoke. *Plant Cell Physiol*, **14(6)**:1167–1176, **1973**.
- [62] **Danon, A. & Gallois, P.** UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **437**:131–136, **1998**.
- [63] **Davletova, S. et al.** The Zinc Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiol.*, **139**:847–856, **2005**.
- [64] **Desclauxa, D. et al.** Identification of Soybean plant Characteristics That Indicate the Timing of Drought Stress. *Crop Sci.*, **40**:716–722, **2000**.
- [65] **Dos Santos, C.V. & Rey, P.** Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends Plant Sci.*, **11(7)**:329–334, **2006**.

- [66] **Eastmond, P.J. et al.** Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.*, **29(2)**:225–235, **2002**.
- [67] **Encinas-Villarejo, S. et al.** Evidence for a positive regulatory role of strawberry (*Fragaria x ananassa*) Fa WRKY1 and *Arabidopsis* At WRKY75 proteins in resistance. *J Exp Bot.*, **60(11)**:3043–3065, **2009**.
- [68] **Enzo Biochem.**, Farmingdale, NY, USA. *BioArray™HighYield™RNA Transcript Labeling Kit (T7)*, **2009**.
- [69] **Favory, J.J. et al.** Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **28**:591–601, **2009**.
- [70] **Feder, M.E. & Walser, J.C.** The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. *J. Evol. Biol.*, **18**:901–910, **2005**.
- [71] **Feis, D.L. & Maiwald, F.** *TransBCS*: A Tool for Binding site and transcription factor regulation analysis. Bayer CropScience, **2007**. Version 1, java-basierte Software.
- [72] **Feussner, K. et al.** Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato - the first stress-induced UBC of higher plants. *FEBS Letters*, **409(2)**:211–215, **1997**.
- [73] **Finkelstein, R.R. et al.** Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell*, **14**:15–45, **2002**.
- [74] **Finn, R.D. et al.** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **36**:D281–288, **2008**. Version 23.0.
- [75] **Fisher, R.A.** The logic of inductive inference. *J R Stat Soc Ser A*, **98**:39–54, **1935**.
- [76] **Fowler D.B. et al.** Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Can. J. Plant Sci.*, **76**:37–42, **1996**.
- [77] **Foyer, C.H. & Halliwell, B.** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **133**:21–25, **1976**.
- [78] **Frohnmeier, H. & Staiger, D.** Update on ultraviolet-B light responses: Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. balancing damage and protection. *Plant Physiol.*, **133**:1420–1428, **2003**.
- [79] **Fujioka, S. & Yokota, T.** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol.*, **54**:137–164, **2003**.
- [80] **Fujita, M. et al.** Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9(4)**:436–442, **2006**.
- [81] **Gao, H. et al.** A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105(42)**:16398–16403, **2008**.

- [82] **Garg, A.** Stress-inducible overexpression of trehalose biosynthetic genes in monocot plants improves drought tolerance and other agronomic traits. Technical report, Cornell University, 2007.
- [83] **Gautier, L. et al.** *affy* - an R package for the analysis of affymetrix genechip data at the probe level. *Bioinformatics*, **20(3)**:307–315, **2003**.
- [84] **Genoud, T. et al.** Numeric simulation of plant signaling networks. *Plant Physiol*, **126**:1430–1437, **2001**.
- [85] **Gentleman, R.C. et al.** Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, **5**:R80, **2004**.
- [86] **Gibson, S.W. et al.** The role of AIR12 as a putative extracellular regulator of developmental and abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*, 2003.
- [87] **Gigolashvili, T. et al.** The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **50(5)**:886–901, **2007**.
- [88] **Giuliano, G. et al.** An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85(19)**:7089–7093, **1988**.
- [89] **Günter, E.A. et al.** Influence of ultraviolet-C on the compositions of cell-wall polysaccharides and carbohydrase activities of *Silene vulgaris* callus. *Carbohydrate Res*, **342**:182–189, **2007**.
- [90] **Gonsalves, S.E. et al.** Whole-genome analysis reveals that active heat shock factor binding sites are mostly associated with non-heat shock genes in *Drosophila melanogaster*. *PLOS One*, **6(1)**:e15934, **2011**.
- [91] **Gosset, W.S.** The probable error of a mean. *Biometrika*, **6(1)**:1–25s, **1908**.
- [92] **Groden, D. & Beck, E.** H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems 2 2 from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **546**:426–433, **1979**.
- [93] **Grossmann, K. & Hansen, H.** Ethylene-triggered abscisic acid: A principle in plant growth regulation? *Physiol Plant*, **113**:9–14, **2001**.
- [94] **Gutierrez, L. et al.** Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.*, **12(7)**:294–300, **2007**.
- [95] **Guy, C. et al.** Metabolomics of temperature stress. *Physiol Plant*, **132(2)**:220–235, **2008**.
- [96] **Guy, C.L.** Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**:187–223, **1990**.
- [97] **Halfter, U. et al.** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**:3735–3740, **2000**.
- [98] **Hansen, H. & Grossmann, K.** Auxin-Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition. *Plant Physiol.*, **124**:1437–1448, **2000**.

- [99] **Hao, G.P. et al.** Nucleotide variation in the NCED3 region of *Arabidopsis thaliana* and its association study with abscisic acid content under drought stress. *J. Integr Plant Biol.*, **51**:175–183, **2009**.
- [100] **Harb, A. et al.** Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant physiol.*, **154**:1254–1271, **2010**.
- [101] **Hartigan J.A. & Wong, M.A.** A K-means Clustering Algorithm. *Applied Statistics*, **28**:100–108, **1979**.
- [102] **Hastie, T. et al.** *The Elements of Statistical Learning*. Springer Verlag, 2. edition, 2009. 14.3.12 Hierarchical clustering.
- [103] **Hattori, T. et al.** Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. *Plant Cell Pyhsiol.*, **43(1)**:136–140, **2003**.
- [104] **He, L. & Hannon, G.J.** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.*, **5(7)**:522–531, **2004**.
- [105] **He, R. et al.** Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, **283(2)**:774–783, **2008**.
- [106] **Hector, E. et al.** *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist*, **175(2)**:255–270, **2007**.
- [107] **Heidecker, G. & Messing, J.** Structural Analysis of Plant Genes. *Annu Rev Plant Physiol*, **37**:439–466, **1986**.
- [108] **Hengen, P.N.** Methods and reagents - carriers for precipitating nucleic acids. *TIBS*, **21(6)**:224–225, **1996**.
- [109] **Henrikson, E. et al.** Homeodomain Leucine Zipper Class I Genes in *Arabidopsis*. expression Patterns and Phylogenetic Relationships. *Plant physiol.*, **139**:509–518, **2005**.
- [110] **Hepworth, S.R. et al.** Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO*, **21(16)**:4327–4337, **2002**.
- [111] **Hirayama, T. & Shinozaki, K.** Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci*, **6**:343–351, **2007**.
- [112] **Hirayama, T. & Shinozaki, K.** Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.*, **61**:1041–1052, **2010**.
- [113] **Hollander, M. & Wolfe, D.A.** *Nonparametric Statistical Methods*. Wiley, New York, 1999.
- [114] **Holtdorf, H. et al.** Plant funtional genomics. *Naturwissenschaften*, **89**:235–249, **2002**.
- [115] **Hong-Bo, S. et al.** Lea proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **45**:131–135, **2005**.
- [116] **Hong, R.L. et al.** Regulatory Elements of the Floral Homeotic Gene AGAMOUS Identified by Phylogenetic Footprinting and Shadowing. *Plant Cell*, **15**:1296–1309, **2003**.

- [117] **Horvath, D.P. et al.** Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cor78 in Response to Low Temperature. *Plant Physiol.*, **103**:1047–1053, **1993**.
- [118] **Horváth, T. et al.** Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul*, **26**:290–300, **2007**.
- [119] **Hou, D.X. et al.** Molecular Mechanisms Behind the Chemopreventive Effects of Anthocyanidins. *J. Biomed. Biotechnol.*, **5**:321–325, **2004**.
- [120] **Hua, Z.M. et al.** Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active *Arabidopsis* MAPKK or MAPK proteins. *Plant Cell Environ*, **29(9)**:1761–1770, **2006**.
- [121] **Huang, D. et al.** Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **50(3)**:414–428, **2007**.
- [122] **Huang, D. et al.** The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J. Exp. Bot.*, **59**:2991–3007, **2008**.
- [123] **Huang, J. et al.** Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant physiol.*, **153**:1526–1538, **2010**.
- [124] **Hubbell, E. et al.** Robust estimators for expression analysis. *Bioinformaticcs*, **18(12)**:1585–1592, **2002**.
- [125] **Hudson, M.E. & Quail, P.H.** Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome. A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol.*, **133**:1605–1616, **2003**.
- [126] **Hugouvieux, V. et al.** An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell*, **106**:477–487, **2001**.
- [127] **Indorf, A.** *Licht- und UV-B-Wirkung auf die Bildung von Lignin, Flavonoiden und Tanninen in Keimlingen der Waldkiefer (Pinus sylvestris L.)*. PhD thesis, Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2001.
- [128] **Invitrogen.** *1 Kb Plus DNA Ladders*, **2002**. Cat. No. 15615-016.
- [129] **Irizarry, R.A. et al.** *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software*. Springer Verlag, **2003**. Kapitel 4.
- [130] **Irizarry, R.A. et al.** Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, **4(2)**:249–264, **2003**.
- [131] **Irizarry, R.A. et al.** Summaries of Affymetrix Genechip probe level data. *Nucleic Acids Res.*, **31(4)**:e15, **2003**.
- [132] **Jacoby, M. et al.** bZIP Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, **7(3)**:106ff, **2003**.
- [133] **Jain, A.K. & Dubes, R.C.** *Algorithms for clustering data*. Computer Science. Prentice Hall, New-York, **1988**.

- [134] **Jansen, M.A.K. et al.** Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.*, **3(4)**:131–135, **1998**.
- [135] **Jenks, M. & Hasegawa, P.M.** *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, UK, **2005**. pp 112-129.
- [136] **Jolliffe, I.T.** *Principal Component Analysis*. Springer Verlag, 2 edition, **2002**. Series in Statistics.
- [137] **Jóri, B. et al.** Role of transporters in paraquat resistance of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Pestic Biochem Physiol.*, **88**:57–65, **2007**.
- [138] **Jung, S.** Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Sci.*, **166(2)**:459–466, **2004**.
- [139] **Kanehisa, M. & Goto, S.** KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.*, **28**:27–30, **2000**. Release 47.1.
- [140] **Kang, J. et al.** *Arabidopsis* Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell*, **14(2)**:343–357, **2002**.
- [141] **Kant, P. et al.** STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-Box RNA Helicases That Attenuate *Arabidopsis* Responses to Multiple Abiotic Stresses. *Plant Physiol.*, **145(3)**:810–830, **2007**.
- [142] **Kaplan, B. et al.** Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequence as Ca²⁺-responsive *cis*-elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**:2733–2748, **2006**.
- [143] **Kasuga, M. et al.** Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol.*, **17**:287–291, **1999**.
- [144] **Katerove, Z. et al.** Low doses of ultraviolet-B or ultraviolet-C radiation affect phytohormones in young pea plants. *Biol Plant*, **53(2)**:365–368, **2008**.
- [145] **Kawaguchi, R. et al.** Water-Deficit-Induced Translational Control in *Nicotiana tabacum*. *Plant, Cell Environ.*, **26**:221–229, **2003**.
- [146] **Kempa, S. et al.** A Central Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism. *PLoS ONE*, **3(12)**:e3935, **2008**.
- [147] **Kende, H. & Zeevaart, J.** The Five "Classical" Plant Hormones. *Plant Cell*, **9(7)**:1197–1210, **1997**.
- [148] **Kilian, J. et al.** The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.*, **50**:347–363, **2007**.
- [149] **Kim, B.C. et al.** UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **15**:667–674, **1998**.
- [150] **Kim, K. et al.** Molecular Characterization of Soybean Ribosomal Protein S13 Targeted to the Nucleus. *Plant, Cell Environ.*, **56(3)**:402–409, **2009**.

- [151] **Kim, S.Y. et al.** Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.*, **11(6)**:1237–1251, **1997**.
- [152] **Kim, S.Y. et al.** The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J. Exp. Botany*, **59(1)**:2991–3007, **2008**.
- [153] **Kimura, M. et al.** Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarrays. *Photochem Photobiol.*, **2**:226–233, **2003**.
- [154] **Kim, S.Y. et al.** Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.*, **11(6)**:1237–1251, **1997**.
- [155] **Klessig, D.F. et al.** Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97(16)**:8849–8855, **2000**.
- [156] **Ko, J. et al.** Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant J.*, **47(3)**:343–355, **2006**.
- [157] **Kotak, S. et al.** Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **10**:310–316, **2007**.
- [158] **Koussevitzky, S. et al.** Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **283(49)**:34197–34203, **2008**.
- [159] **Kovacs, D. et al.** Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant protein. *Plant Physiol.*, **147(1)**:381–390, **2008**.
- [160] **Krebs, H.** The History of the Tricarboxylic Acid cycle. *Perspect. Biol. Med.*, **14**:154–170, **1970**.
- [161] **Kreps, J.A. et al.** Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*, **130**:2129–2141, **2002**.
- [162] **Kuraishi, S. & Muir, R.M.** The relationship of gibberellin and auxin in plant growth. *Plant Cell Physiol.*, **5(1)**:61–69, **1964**.
- [163] **Kurek, I. et al.** Enhanced Thermostability of *Arabidopsis* Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress. *Plant Cell*, **19(10)**:3230–3241, **2007**.
- [164] **Kurt Hornik.** The R FAQ, **2008**. ISBN 3-900051-08-9.
- [165] **Lampart, D.T.A. et al.** The role of GIGANTEA gene in mediating the oxidative stress response and in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul.*, **48**:261–270, **2006**.
- [166] **Landry, L.G. et al.** *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.*, **109**:1159–1166, **1995**.
- [167] **Larkindale, J. et al.** Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol.*, **138**:882–897, **2005**.

- [168] **Lawlor, D.W.** Absorption of polyethyleneglycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytol.*, **69**:501–513, **1970**.
- [169] **Lenvik, T.R. et al.** Ribosomal Protein S11 Genes from *Arabidopsis* and Soybean. *Plant Physiol.*, **105**:1027–1028, **1994**.
- [170] **Levine, M. & Tjian, R.** Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, **424**:147–151, **2003**.
- [171] **Li, C. & Clarke, S.** A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary-phase survival and heat-shock resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:9885–9889, **1992**.
- [172] **Li, J. et al.** *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell*, **5**(2):171–179, **1993**.
- [173] **Li, W. et al.** The *Arabidopsis* NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *Plant Cell*, **20**:2238–2251, **2008**.
- [174] **Li, Y. et al.** Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.*, **16**:414–427, **2006**.
- [175] **Liberek, K. et al.** Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J.*, **146**:328–335, **27**.
- [176] **Lim, W.K. et al.** Comparative analysis of microarray normalization procedures: effects on reverse engineering gene networks. *Bioinformatics*, **23**(13):282–288, **2007**.
- [177] **Lipniacki, T. et al.** Mathematical model of NF-kappaB regulatory module. *J Theor Biol*, **228**(2):195–215, **2004**.
- [178] **Lippok, B. et al.** Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen- or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Mol Plant Microbe Interact.*, **20**(4):420–429, **2007**.
- [179] **Liu, J. & Zhu, J.K.** A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, **280**:1943–1945, **1998**.
- [180] **Liu, J.X. et al.** Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J.*, **51**:897–909, **2007**.
- [181] **Liu, Q. et al.** Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**:1391–1406, **1998**.
- [182] **Liu, X. & Baird, W.V.** Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. *Crop Sci.*, **43**:678–687, **2003**.
- [183] **Livaja, M. et al.** The effect of the bacterial effector protein harpin on transcriptional profile and mitochondrial proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Proteomics*, **71**:148–159, **2008**.

- [184] **Lockhart, D.J. et al.** Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech.*, **13**:1675–1680, **1996**.
- [185] **Logemann, E. & Hahlbrock, K.** Crosstalk among stress responses in plants: Pathogen defense overrides UV protection through an inversely regulated ACE/ACE type of light-responsive gene promoter unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99(4)**:2428–2432, **2001**.
- [186] **Lu, P.L. et al.** A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **63**:289–305, **2007**.
- [187] **Luci, S. et al.** Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **27(4)**:325–333, **2001**.
- [188] **Ma, S. & Bohnert, H.J.** Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology*, **8**:R49, **2007**. doi:10.1186/gb-2007-8-4-r49.
- [189] **Ma, S. et al.** Dissecting salt stress pathways. *J. Exp. Bot.*, **57(5)**:1097–1107, **2006**.
- [190] **Mackerness, S.A.H.** Plant response to ultraviolet-B (UV-B : 280-320 nm) stress: What are the key regulators? *Plant Growth Regul.*, **32**:27–39, **2000**.
- [191] **MAQC Consortium et al.** The Microarray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.*, **24(9)**:1151–1161, **2006**.
- [192] **Mardia, K. et al.** Multivariate analysis. *Academic Press*, **1979**.
- [193] **Marguerat, S. et al.** Next-generation sequencing: applications beyond genomes. *Biochemical Society Transactions*, **36(5)**:1091–1096, **2008**.
- [194] **Martínez, I.M. & Chrispeels, M.J.** Genomic Analysis of the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis* Shows Its Connection to Important Cellular Processes. *Plant Cell*, **15**:561–576, **2003**.
- [195] **Maruyama-Nakashita, A. et al.** Identification of a novel *cis*-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, **42**:305–314, **2005**.
- [196] **Mateo, A. et al.** Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J. Exp. Bot.*, **57**:1795–1807, **2006**.
- [197] **Matsui, A. et al.** *Arabidopsis* Transcriptome Analysis under Drought, Cold, High-Salinity and ABA Treatment Conditions using a Tiling Array. *Plant Cell Physiol.*, **49(8)**:1135–1149, **2008**.
- [198] **Mattsson, J. et al.** Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.*, **131**:1327–1339, **2003**.
- [199] **McCasland, M.R. et al.** Characterization of AtMYB50 expression in relation to cytokinin, **2003**.

- [200] **Medda, R. et al.** Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry*, **39(1)**:1–9, **1995**.
- [201] **Meißner, D. et al.** The role of UDP-glucose:hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **228**:663–674, **2008**.
- [202] **Merzlyak, M.N. & Chivkunova, O.B.** Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **55(2-3)**:155–163, **2000**.
- [203] **Merzlyak, M.N. & Chivkunova, O.B.** Antioxidation of anthocyanins in photosynthesis under high temperature stress. *J Integr Plant Biol*, **49(9)**:155–163, **2007**.
- [204] **Metzker, M.L. et al.** Sequencing technologies - the next generation. *Nature Rev. Gen.*, **11**:31–46, **2010**.
- [205] **Meurs, C. et al.** Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **98**:1484–1493, **1992**.
- [206] **Michaels, S.D. et al.** AGL24 acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *Plant J.*, **33(5)**:867–874, **2003**.
- [207] **Michelet, L. et al.** Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102(45)**:16478–16483, **2005**.
- [208] **Miller, G. & Mittler, R.** Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. of Botany*, **98**:279–288, **2006**.
- [209] **Miller, G. et al.** Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development and response to abiotic stresses. *Plant Physiol.*, **144**:1777–1785, **2007**.
- [210] **Mishra, S.K. et al.** In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.*, **16(12)**:1555–1567, **2002**.
- [211] **Mitsunori, S. et al.** The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97(23)**:12908–12913, **2000**.
- [212] **Mittler, R.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, **7(9)**:405–410, **2002**.
- [213] **Mittler, R.** Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.*, **11(1)**:15–19, **2006**.
- [214] **Mäntylä, E. et al.** Role of Abscisic Acid in Drought-Induced Freezing Tolerance, Cold Acclimation, and Accumulation of LT178 and RAB18 Proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **107**:141–148, **1995**.
- [215] **Mohanty, B. et al.** Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. *Ann Bot.*, **96**:669–681, **2005**.

- [216] **Mootha, V.K. et al.** PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, **34**:267–273, **2003**.
- [217] **Morimoto, R.I.** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.*, **12**:3788–3796, **2009**.
- [218] **Morita, E.H. et al.** Implications of the zinc-finger motif found in the DNA-binding domain of the human XPA protein. *Genes Cells*, **1**:437–442, **1996**.
- [219] **Mueller, L.A. et al.** AraCyc: A Biochemical Pathway Database for Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **132**:453–460, **2003**. Version 4.5.
- [220] **Murashige, T. & Skoog, F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**(3):473–497, **1962**.
- [221] **Mustilli, A.C. et al.** *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*, **14**:3089–3099, **2002**.
- [222] **Nagpal, P. et al.** Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, **132**:4107–4118, **2005**.
- [223] **Nakashima, K. et al.** Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stress in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol.*, **149**:88–95, **2009**.
- [224] **Narasimhan, B. & Tibshirani, R.** SAM: Significance Analysis of Microarrays. R Software package, **2007**. Windows XP, R Version 2.8.0.
- [225] **Narusaka, Y. et al.** Interaction between two cis-acting elements, abre and dre, in abscisic acid-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.*, **34**(2):137–148, **2003**.
- [226] **Nikitin, A.** Pathway studio - the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics*, **19**(16):2155–2157, **2003**.
- [227] **Nishimura, N. et al.** PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.*, advance online publication, **2009**.
- [228] **Nishizawa, A. et al.** *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J.*, **48**:535–547, **2006**.
- [229] **Niu, X. et al.** Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol.*, **109**:735–742, **1995**.
- [230] **Noctor, G. & Foyer, C.H.** ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **49**:249–279, **1998**.
- [231] **Norhølm, M.H.H. et al.** Expression of the *Arabidopsis* high-affinity hexose transporter STP13 correlates with programmed cell deaths. *FEBS Letters*, **580**:2381–2387, **2006**.
- [232] **Nover, L. et al.** *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress & Chaperones*, **6**(3):177–189, **2001**.

- [233] **Ogawa, M. et al.** Gibberellin Biosynthesis and Response during *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Cell*, **15**:1591–1604, **2003**.
- [234] **Oh, I.H. & Reddy, E.P.** The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, **18(19)**:3017–3033, **1999**.
- [235] **Oliveros, J. C.** An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams., 2007.
- [236] **Olsen, A.N. et al.** NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci.*, **10(2)**:79–87, **2005**.
- [237] **Panchuk, I.I. et al.** Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **129**:838–853, **2002**.
- [238] **Panikulangara, T.J. et al.** Galactinol synthase1. a Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **136**:3148–3158, **2004**.
- [239] **Park, S.J. et al.** *Arabidopsis* R2R3-MYB transcription factor AtMYB60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell Reports*, **27(6)**:985–994, **2008**.
- [240] **Parman, C. & Halling, C.** *affyQCReport: A Package to Generate QC Reports for Affymetrix Array Data*, **2008**. R package version 2.7.2.
- [241] **Parzen, E.** On estimation of a probability density function and mode. *Ann Math Stat*, **33**:1065–1076, **1962**.
- [242] **Pastore, D. et al.** Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *J. Exp. Bot.*, **58(2)**:195–210, **2007**.
- [243] **Pastori, G.M. & Foyer, C.H.** Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. the central role of „redox“ and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiol*, **129**:460–468, **2002**.
- [244] **Paulsen, G.M.** High temperature responses of crop plants. *n. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **1994**. WI ASA-CSSA-SSSA.
- [245] **Pearson, K.** On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philosophical Magazine*, **2(6)**:559–572, **1901**.
- [246] **Peng, M. et al.** Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene NLA. *Plant Mol Biol*, **65**:775–797, **2007**.
- [247] **Planchais, S. et al.** Characterization of *cis*-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath*;CycB1;1 transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant Mol Biol.*, **50**:111–127, **2002**.
- [248] **Pomeranz, M.C. et al.** The *Arabidopsis* Tandem Zinc Finger Protein AtTZF1 Traffics between the Nucleus and Cytoplasmic Foci and Binds Both DNA and RNA. *Plant Physiol*, **152**:151–165, **2010**.

- [249] **Ponjavic, J. et al.** Functionality or transcriptional noise? evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Research*, **17(5)**:556–565, **2007**.
- [250] **Prakash, J.S.S. et al.** Alterations in Electron Transport Characteristics during Senescence of *Cucumis* Cotyledonary Leaves. Analysis of the Effects of Inhibitors. *Photosynthetica*, **35(3)**:345–352, **1998**.
- [251] **Preger, V. et al.** Auxin-Responsive Genes AIR12 Code for a New Family of Plasma Membrane b-Type Cytochromes Specific to Flowering Plants. *Plant physiol.*, **150**:606–620, **2009**.
- [252] **Qiagen**, Hilden, Deutschland. *RNeasy Mini Handbook*, 4 edition, **2006**.
- [253] **Qin, D. et al.** Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome array. *BMC Genomics*, **9**:432, **2008**.
- [254] **Rakitin, V.Y. et al.** UV-B Stress-Induced ABA Production in *Arabidopsis thaliana* Mutants Defective in Ethylene Signal Transduction Pathway. *Russ J Plant Physiol*, **55(6)**:854–856, **2008**.
- [255] **Ramonell, K. et al.** Loss-of-Function Mutations in Chitin Responsive Genes Show Increased Susceptibility to the Powdery Mildew Pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.*, **138**:1027–1036, **2005**.
- [256] **Rizhsky, L. et al.** When Defense Pathways Collide. The Response of *Arabidopsis* to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiol.*, **134**:1683–1696, **2004**.
- [257] **Rodrigo, R. & Bosco, C.** Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.*, **142**:317–327, **2006**.
- [258] **Rossel, J.B. et al.** Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**:4091–4110, **2007**.
- [259] **Rossini, S. et al.** Suppression of Both ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis* Does Not Affect Tolerance to Photoinhibition and Photooxidative Stress. *Plant Physiol.*, **141(4)**:1264–1273, **2006**.
- [260] **Rouhier, N. et al.** Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol.*, **134(3)**:1027–1038, **2004**.
- [261] **Rozema, J. et al.** Stratospheric ozone reduction and ecosystem processes: enhanced UV-B radiation affects chemical quality and decomposition of leaves of the dune grassland species *Calamagrostis epigeios*. *Plant Ecology*, **128(1-2)**:285–294, **1997**.
- [262] **Sabio, N.J.M. et al.** Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Bot.*, **103(4)**:609–623, **2009**.
- [263] **Sablowski, R.W. et al.** A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.*, **13(1)**:128–137, **1992**.
- [264] **Saito, S. et al.** *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol*, **134**:1439–1449, **2004**.

- [265] **Sakuma, Y. et al.** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**:998–1009, **2002**.
- [266] **Sakuma, Y. et al.** Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant cell*, **18**:1292–1309, **2006**.
- [267] **Santiago, J. et al.** The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, advance online publication, **2009**.
- [268] **Santos Mendoza, M. et al.** Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **54**(4):608–620, **2008**.
- [269] **Sazzad, K. et al.** Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Mol. Biol.*, pages 371–386, **2007**.
- [270] **Schena, M. et al.** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarrays. *Science*, **270**:467–470, **1995**.
- [271] **Schindler, U. et al.** Tga1 and g-box binding factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the g-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell*, **4**:1309–1319, **1992**.
- [272] **Schmadel-Hageböiling, H.E. et al.** The combined effects of CO₂, ozone, and drought on Rubisco and nitrogen metabolism of young oak trees (*Quercus petraea*) - A phytotron study. *Chemosphere*, **36**:789–794, **1998**.
- [273] **Schramm, F. et al.** The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **60**:759–772, **2006**.
- [274] **Schramm, F. et al.** A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **53**(2):264–274, **2007**.
- [275] **Schramm, F. et al.** A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*. *Plants J.*, **53**:264–274, **2008**.
- [276] **Schreck, R. & Baeuerle, P.A.** A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol*, **1**:39–42, **1991**.
- [277] **Schroeder, J.I. et al.** Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **52**:627–658, **2001**.
- [278] **Söderman, E. et al.** The *Arabidopsis* homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.*, **10**(2):375–381, **1996**.
- [279] **Seki, M.** Monitoring the Expression Pattern of 1300 *Arabidopsis* Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant J.*, **13**:61–72, **2001**.
- [280] **Seki, M. et al.** Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.*, **31**(3):279–292, **2002**.

- [281] **Sembdner, G. & Parthier, B.** The Biochemistry and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **44**:569–589, **1993**.
- [282] **Seo, P.J. et al.** The MYB96 Transcription Factor Mediates Abscisic Acid Signaling during Drought Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **151**:275–289, **2009**.
- [283] **Shaffer, J.P.** Multiple hypothesis testing. *Annu Rev of Psychol*, **46**:561–584, **1995**.
- [284] **Shanker, A.K.** Countering UV-B stress in plants: Does selenium have a role? *Plant and Soil*, **282**:212–26, **2006**.
- [285] **Shendure, J. et al.** Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotech.*, **26**:1135–1145, **2008**.
- [286] **Shinozaki, K. & Shinozaki, K.Y.** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**(3):217–223, **2000**.
- [287] **Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K.** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot.*, **58**:221–227, **2007**.
- [288] **Shinozaki, K. et al.** Regulatory networks of gene expression in the drought and cold stress responses. *Cur. Opin. in Plant Biol.*, **6**:410–417, **2003**.
- [289] **Shulaev, V. et al.** Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant*, **132**(2):199–208, **2008**.
- [290] **Simpson, S.D. et al.** Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.*, **33**:259–270, **2007**.
- [291] **Smirnof, N.** *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell publishing, Oxford, UK, **2005**.
- [292] **Smith, S.J.** *Understanding genetic regulation of UV-B responses in Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, Department of Biology and Marine Biology, University of North Carolina Wilmington, **2008**.
- [293] **Smyth, G.K.** Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, **3** (Iss. 1):Article 3, **2004**.
- [294] **Smyth, G.K.** *Limma: linear models for microarray data*, chapter 23. Springer, New York, **2005**. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds.). pp. 397-420.
- [295] **Solanke, A.U. & Sharma, A.K.** Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **14**(1-2):69–79, **2008**.
- [296] **Stephenson, P.G.** *The regulation of tetrapyrrole biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, Universität von Southampton, School of Biological Sciences, **2009**. <http://eprints.soton.ac.uk/66716/>.

- [297] **Stålberg, K. et al.** Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds. *Planta*, **199(4)**:515–519, **1996**.
- [298] **Strid, Å. et al.** Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Photosyn. Res.*, **39**:475–489, **1994**.
- [299] **Subramanian, A. et al.** Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *pnas*, **102(43)**:15545–50, **2005**.
- [300] **Sunkar, R. et al.** Small rnas as bigplayers in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci.*, **12**:301–309, **2007**.
- [301] **Suzuki, M. et al.** Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. *Plant Physiol*, **132(3)**:1664–1677, **2003**.
- [302] **Swarbreck, D. et al.** DATF: a Database of Arabidopsis Transcription Factors. *Bioinformatics*, **21**:2568–2569, **2005**. Version 2.
- [303] **Swarbreck, D. et al.** The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.*, **36**:D1009–D1014, **2008**. Version 8.
- [304] **Swindell, W.R. et al.** The association among gene expression responses to nine abiotic stress treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **2006**. doi:10.1534/genetics.106.061374.
- [305] **Swindell, W.R. et al.** Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, **8**:125, **2007**.
- [306] **Szostkiewicz, I. et al.** Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J.*, **2009**. Epub ahead of print.
- [307] **Tarifa, Y. et al.** The Nuclear RPL4 Gene Encodes a Chloroplast Protein That Co-purifies with the T7-like Transcription Complex as well as Plastid Ribosomes. *J. Biol. Chem.*, **237**:3980–3985, **1998**.
- [308] **Tatematsu, K. et al.** Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **138(2)**:757–766, **2005**.
- [309] **Teige, M. et al.** The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signalin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, **15**:141–152, **2004**.
- [310] **Tepperman, J. M. et al.** Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:9437–9442, **2001**.
- [311] **The Gene Ontology Consortium.** Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*, **25(1)**:25–29, **2000**.
- [312] **Thimm, O. et al.** MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.*, **37(6)**:914–39, **2004**. Version 2.2.0.

- [313] **Thomashow, M.F.** Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Ann. Rev. Plant biol.*, **50**:517–599, **1999**.
- [314] **Tracy, S.** Improved rapid methodology for the isolation of nucleic acids from agarose gels. *Prep. Biochem.*, **11**:251–268, **1981**.
- [315] **Tremousaygue, D. et al.** Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.*, **20(5)**:553–561, **1999**.
- [316] **Tripp, J.** *Funktionsanalyse von Hitzestressproteinen aus *Lycopersicon esculentum**. PhD thesis, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2005.
- [317] **Trémousaygue, D. et al.** Internal telomeric repeats and "TCP-domain" protein binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.*, **33**:957–966, **2003**.
- [318] **Tukey, J.W.** *Box-and-Whisker Plots, in Explanatory Data Analysis*. MA: Addison-Wesley, Reading, **1977**.
- [319] **Tusher, V.G. et al.** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98(9)**:5116–5121, **2001**.
- [320] **Ulm, R. & Nagy, F.** Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Cur. Opin. Plant Biol.*, **8**:477–482, **2005**.
- [321] **Ulm, R. et al.** Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101(5)**:1397–1402, **2004**.
- [322] **Uno, Y. et al.** *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **10**:11632–11637, **2000**.
- [323] **Vandepoele, K. et al.** Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.*, **16(3)**:414–427, **2006**.
- [324] **Vandepoele, K. et al.** Identification of novel regulatory modules in dicotyledonous plants using expression data and comparative genomics. *Genome Biol.*, **7(11)**:R103, **2006**.
- [325] **Vanderauwera, S. et al.** Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol.*, **139(2)**:806–821, **2005**.
- [326] **Venter, M. & Botha, F.C.** Promoter analysis and transcription profiling: Integration of genetic data enhances understanding of gene expression. *Physiol Plant*, **120**:74–83, **2004**.
- [327] **Verslues, P.E. et al.** Root Growth and Oxygen Relations at Low Water Potentials. Impact of Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions. *Plant Physiol.*, **116**:1403–1412, **1998**.
- [328] **Verslues, P.E. et al.** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.*, **45**:523–539, **2006**.

- [329] **Viswanathan, C. & Zhu, J.K.** Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *n. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **357**:877–886, **2002**.
- [330] **Volkov, R.A. et al.** Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **61**:733–746, **2006**.
- [331] **von Koskull-Döring, P. et al.** The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.*, **12(10)**:452–457, **2003**.
- [332] **Wang, S. et al.** Control of Plant Trichome Development by a Cotton Fiber MYB Gene. *Plant Cell*, **16(9)**:2323–2334, **2004**.
- [333] **Wang, Z. et al.** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Rev. Gen.*, **10(1)**:57–63, **2009**.
- [334] **Welchen, E. & Gonzales, D.H.** Differential expression of the *Arabidopsis* cytochrome c genes Cytc-1 and Cytc-2. Evidence for the involvement of TCP-domain protein-binding elements in anther- and meristem-specific expression of the Cytc-1 gene. *Plant Physiol.*, **139**:88–100, **2005**.
- [335] **Welchen, E. & Gonzales, D.H.** Overrepresentation of Elements Recognized by TCP-Domain Transcription Factors in the Upstream Regions of Nuclear Genes Encoding Components of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Machinery. *Plant Physiol.*, **141**:540–545, **2006**.
- [336] **Welihinda, A.A. et al.** Protein Serine/Threonine Phosphatase Ptc2p Negatively Regulates the Unfolded-Protein Response by Dephosphorylating Ire1p Kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **18**:1967–1977, **1998**.
- [337] **Weston, D.J. et al.** Connecting genes, coexpression modules, and molecular signatures to environmental stress phenotypes in plants. *BMC Syst Biol*, **4**:2–16, **2008**.
- [338] **Westwood, J.T. et al.** Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature*, **353**:822–827, **1991**.
- [339] **Willekens, H. et al.** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J.*, **16**:4806–4816, **1997**.
- [340] **Wilson, C. et al.** QC and affymetrix data. *Bioinformatics*, **2005**.
- [341] **Wilson, C.L. & Miller C.J.** Simpleaffy: a Bioconductor package for affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics*, **21(18)**:3683–3685, **2005**.
- [342] **Wu, Z. et al.** A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc*, **99(468)**:909–917, **2004**.
- [343] **Wyn Jones, R.G. & Pollard, A.** *Proteins, enzymes and inorganic ions*. Encyclopedia of plant physiology, New series. Lauchli, A. and Pirson, A., eds. 528-562. Springer, Berlin, **1983**.
- [344] **Xia, H. et al.** siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotech.*, **20**:1006–1010, **2002**.
- [345] **Xie, Q. et al.** *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, **14(23)**:3024–3036, **2000**.

- [346] **Xie, Q. et al.** Gene regulatory network controlled by NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J.*, **2010**. Published Online: 22 Jan 2010.
- [347] **Xie, Z. et al.** Regulatory networks of the phytohormone abscisic acid. *Vitam Horm.*, **72**:235–236, **2005**.
- [348] **Xiong, L. et al.** Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, **1**:771–781, **2002**.
- [349] **Yamaguchi, K. et al.** The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **580**:6783–6788, **2006**.
- [350] **Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**:781–803, **2006**.
- [351] **Yamasaki, S. et al.** Continuous UV-B Irradiation Induces Endoreduplication and Peroxidase Activity in Epidermal Cells Surrounding Trichomes on Cucumber Cotyledons. *J. Radiat. Res.*, 2010.
- [352] **Yamashita, A. et al.** Quality control of Photosystem II: Reactive oxygen species are responsible for the damage to Photosystem II under moderate heat stress. *J. Biol. Chem.*, **283**(42):28380–28391, **2008**.
- [353] **Yan, N. et al.** The Ubiquitin-Specific Protease Family from *Arabidopsis*. atUBP1 and 2 Are Required for the Resistance to the Amino Acid Analog Canavanine. *Plant Physiol*, **124**:1828–1843, **2000**.
- [354] **Yordanov, I. et al.** Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, **38**(1):171–186, **2000**.
- [355] **Yoshida, K. et al.** Influence of Chloroplastic Photo-Oxidative Stress on Mitochondrial Alternative Oxidase Capacity and Respiratory Properties: A Case Study with *Arabidopsis yellow variegated 2*. *Plant and Cell Physiol.*, **49**(4):592–603, **2008**.
- [356] **Yoshida, T. et al.** Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**(3):515–521, **2008**.
- [357] **Zahng, R. & Sharkey, T.D.** Photosynthetic electron transport and proton flux under moderate heat stress. *Photosyn. Res.*, **100**(1):29–43, **2009**.
- [358] **Zeeman, S.C. et al.** Chloroplastic starch phosphorylase is not required for transitory starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiol*, **135**:849–858, **2004**.
- [359] **Zhang, Y. et al.** F-box Protein DOR Functions As a Novel Inhibitory Factor for Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure under Drought Stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **148**(4):2121–2133, **2008**.

-
- [360] **Zhou, X. et al.** UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology*, **3**:103, **2007**.
- [361] **Zhu, J.K.** Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annl. Rev. Plant Biol.*, **53**:47–73, **2002**.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich auf diesem langen Weg begleitet und zur Vollen-
dung dieser Arbeit beigetragen haben. Einige dieser Personen, die einem besonderem Dank würdig
sind, möchte ich hier kurz erwähnen.

Ein sehr großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Marco Busch für die Bereitstellung des Thema, die stete
Unterstützung und den regen Ideenaustausch während des experimentellen Teils der Arbeit, die wesent-
lich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus möchte ich Herr Dr. Mark-Christoff Ott für seine enge Zusammenarbeit, die entge-
gengesetzte Interesse und hilfreiche Kommentare während seiner Betreuung des analytischen Teils
dieser Arbeit.

Prof. William Martin danke ich herzlich für seine motivierende Unterstützung und immerwährende
Diskussionsbereitschaft während der gesamten Arbeitszeit. Ebenfalls möchte ich mich für die sorg-
fältige Durchsicht dieser Dissertation.

Ein besonderer herzlicher Dank gilt Corinna v. Almsick für ihre Geduld, Ausdauer und ständige
Hilfe beim Aufbau des Experimentes, für ihre und Franke Hübner Hilfe bei der Vorbereitung und
Ausführung der Hochdurchsatzexperimenten sowie die fachliche und emotionale Unterstützung der
kompletten Biochemie und Gene Expression Profiling-Arbeitsgruppe vom Bayer CropScience im
Industrie-Park Höchst.

Fr. Dr. Edda Koppmann, die mir die Gelegenheit gab, Fr. Catherine Sirven für ihre kontinuierliche
und erfolgreiche Unterstützung und Herr Dr. Michael Beck, der die technische bzw. administrative
Seite dieser Arbeit ständig im Auge behalten hat, sei gedankt. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht
vervollständigen können.

Für das Bfx-Team in Monheim, Frank Maiwald, Corinna Schorn und Dirk Mahlcke sowie die Mit-
arbeiter in der Discovery-Gruppe möchte ich ganz herzlich für die unendliche Hilfe, die anregende
Diskussionsbereitschaft und die fachliche Förderung bei der Analyse der Daten bedanken.

Mein letzter und wertvollster Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe, meiner Frau
und meinen Kindern für ihre Geduld, ihre Ausdauer, ihr Verständnis und die emotionale Unterstüt-
zung in schweren Momenten. **Ich danke euch vom ganzen Herzen.**

A folk that doesn't know its past
has a poor present
and its future is vague
(Ygal Alon)

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Düsseldorf, 01.12.2011

.....
(Assa Yeroslaviz)

Aus dem Institut für Pflanzenphysiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. William Martin

Koreferent: Prof. Laura Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2013