

---

---

# Die Regulierung des Pflanzenmetabolismus unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen

---

---

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Melanie Verena Paul  
München, 2018

Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Geigenberger  
an der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstgutachter: Prof. Dr. Peter Geigenberger  
Zweitgutachterin: PD Dr. Cordelia Bolle

Tag der Abgabe: 25.09.2018  
Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2018

## Zusammenfassung

Pflanzen erfahren verringerte Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) durch externe Faktoren wie Überschwemmung oder aufgrund ihrer Anatomie in metabolisch sehr aktiven sowie in besonders dichten Geweben, da sie kein aktives Sauerstofftransport-System ausbilden können. Einen wesentlichen Bestandteil der genetischen Regulation unter Hypoxie stellen dabei Ethylene Response Factor Group VII (ERFVII) Transkriptionsfaktoren dar, die bei Anwesenheit von Sauerstoff über den N-end rule pathway dem proteasomalen Abbau zugeführt und folglich nur unter Hypoxie stabilisiert und damit aktiviert werden. Einer der initialen ERFVII Transkriptionsfaktoren ist RELATED TO APETALA 2.12 (RAP2.12). Bisherige Studien stellten im Zusammenhang mit RAP2.12 hauptsächlich Änderungen auf transkriptioneller Ebene dar, der daraus resultierende Einfluss auf den Metabolismus wurde meist jedoch nicht weiter behandelt. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit durch Überexpression einer N-end rule pathway-sensitiven und einer -insensitiven, konstitutiv stabilisierten Form von RAP2.12 in *Arabidopsis thaliana* näher untersucht. Die Stabilisierung von RAP2.12 löste dabei eine permanente Umstellung des Pflanzenmetabolismus auf sauerstoffarme Bedingungen aus, was weitreichende Folgen für die Fitness sowie die Entwicklung der Pflanzen hatte. So wurde durch die Stabilisierung von RAP2.12 sowohl die Transkription für Fermentationsenzyme als auch ihre Abundanz erhöht, was zur Anregung des Gärungsstoffwechsels führte. Entsprechend war auch im Metabolitprofil der Pflanzen unter RAP2.12 Stabilisierung ersichtlich, dass die Glykolyse stark aktiviert war, was zu verringerten Mengen des Kohlenhydratspeichers Stärke und einer Anreicherung an Pyruvat führte. Zusätzlich waren die Mengen an Amino- und organischen Säuren deutlich erhöht – ebenfalls ein charakteristisches Zeichen für die Umstellung des Metabolismus auf hypoxische Bedingungen. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors führte neben der Aktivierung der Fermentation auch zur proaktiven Inhibierung der Atmung, was sich negativ auf den Adenylatenergiestatus der Pflanzen auswirkte. Außerdem wurde die Immunantwort der Pflanzen aktiviert und ihre Photosynthese inhibiert. Letzteres verschärfte den Mangel an Kohlenhydraten zusätzlich und führte so zu einem verzögerten Wachstum der Pflanzen sowie zu einer verringerten Resistenz gegenüber hypoxischem Stress. Zusätzlich wurde festgestellt, dass morphologische Auswirkungen der RAP2.12 Stabilisierung auf die Blattentwicklung mit einem reduzierten Chlorophyllgehalt sowie erhöhtem oxidativen Stress verbunden waren. Die Ergebnisse belegen, dass die sauerstoffabhängige Regulation von RAP2.12 für die Funktionalität des Stoffwechsels und folglich für die pflanzliche Entwicklung und Stressresistenz unerlässlich ist.

## Summary

Plants experience low-oxygen conditions (hypoxia) through external factors like flooding or due to their anatomy in highly metabolically active tissues and in very dense tissues, not being able to build up an active oxygen transport system. Major components of genetic regulation under hypoxia are ethylene-response factor group VII (ERFVII) transcription factors, which are degraded by the proteasome in the presence of oxygen via the N-end rule pathway and, consequently, stabilized and activated under hypoxia. One of the initial ERFVII transcription factors is RELATED TO APETALA 2.12 (RAP2.12). Previous studies on RAP2.12 mainly focused on transcriptional changes, but the effects on metabolism were mostly not further investigated. In order to do so, *Arabidopsis thaliana* plants over-expressing a N-end rule pathway-sensitive and an -insensitive, constitutively stabilized form of RAP2.12 were investigated. Stabilization of RAP2.12 led to a permanent rearrangement of metabolism to low-oxygen conditions, having tremendous effects on plant fitness and development. RAP2.12 stabilization increased transcription for fermentation enzymes as well as their abundance, leading to the activation of fermentative metabolism. Accordingly, metabolite profiling of plants over-expressing the stabilized version of RAP2.12 revealed a strong activation of glycolysis, resulting in decreased amounts of the carbohydrate storage starch and increased levels of pyruvate. Additionally, pools of amino and organic acids were clearly increased – another attribute of the switch to hypoxic metabolism. Besides the induction of fermentation, the activity of the transcription factor led to the proactive inhibition of respiration, which had negative effects on the adenylate energy state of the plants. Additionally, the immune response of plants was activated and photosynthesis was inhibited. The latter further exacerbated the lack of carbohydrates, causing impairments in plant growth and hypoxic resistance. Furthermore, it could be shown that morphological consequences of the RAP2.12 stabilization on leaf development were coupled with reduced chlorophyll content as well as increased oxidative stress. The results show that oxygen-dependent regulation of RAP2.12 is indispensable for metabolic performance and, accordingly, for plant development and stress resistance.

## Inhalt

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Summary .....</b>	<b>II</b>
<b>Inhalt.....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Verringerte Sauerstoffkonzentrationen in Pflanzen .....	1
1.2 Die Umstellung des Primärstoffwechsels unter Hypoxie .....	2
1.3 Transkriptionelle Regulation und ERFVII Transkriptionsfaktoren .....	5
1.3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die Transkription.....	5
1.3.2 ERFVII Transkriptionsfaktoren und ihre sauerstoffabhängige Stabilität.....	6
1.3.3 Die Interaktionspartner von RAP2.12.....	9
1.4 Auswirkungen von Hypoxie auf die Pflanzenentwicklung .....	10
1.5 Hintergründe und Ziele der Arbeit.....	12
1.5.1 Widersprüchliche Ergebnisse bisheriger Studien .....	12
1.5.2 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	13
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Pflanzenlinien und Wachstumsbedingungen.....	14
2.1.1 Verwendete Linien .....	14
2.1.2 Anzucht auf Erde .....	14
2.1.3 Anzucht auf Agarplatten .....	15
2.1.4 Anzucht in Halbflüssigkultur.....	15
2.1.5 Anzucht in Mikrotiterplatten.....	16
2.2 Dokumentation des Pflanzenwachstums .....	16
2.2.1 Pflanzenentwicklung nach BBCH.....	16
2.2.2 Bestimmung des Frischgewichts.....	16

## INHALT

2.3	Behandlung und Ernten der Pflanzen .....	17
2.3.1	Begasung und Ernte von Erdkulturen .....	17
2.3.2	Begasung und Ernte steriler Plattenkulturen .....	17
2.3.3	Mitochondrien-Isolation.....	17
2.3.4	Ernte zu verschiedenen Tageszeitpunkten .....	18
2.3.5	Nach Blattalter separierte Ernte .....	18
2.4	Messung der Atmungsrate.....	19
2.5	Gaswechsel-Messung .....	19
2.6	Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz mittels Pulsamplitudenmodulation .....	19
2.7	Quantifizierung von Transkripten .....	20
2.7.1	Isolation der mRNA.....	20
2.7.2	Synthese der cDNA .....	20
2.7.3	Quantitative real time PCR .....	20
2.8	Messung von Enzymaktivitäten.....	22
2.8.1	Alkohol Dehydrogenase.....	22
2.8.2	Pyruvat Decarboxylase .....	22
2.8.3	Laktat Dehydrogenase.....	23
2.8.4	Alanin Aminotransferase.....	23
2.8.5	Succinat Dehydrogenase.....	23
2.9	Quantifizierung von Metaboliten.....	24
2.9.1	Quantifizierung von Ethanol.....	24
2.9.2	Metabolitquantifizierung mittels GC-TOF-MS.....	24
2.9.3	Quantifizierung von Stärke und löslichen Zuckern .....	25
2.9.4	Quantifizierung von Pyridinnukleotiden .....	26
2.9.5	Quantifizierung von ATP und ADP .....	27
2.9.6	Quantifizierung von Glutathion.....	27
2.10	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot .....	28
2.11	Bestimmung des Chlorophyllgehalts .....	29
2.12	Statistische Auswertung.....	30
2.13	Verwendete Chemikalien .....	30

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1	Die Bedeutung von RAP2.12 für die Gärung bei normalem und verringertem Sauerstoffgehalt .....	31
3.1.1	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Expression hypoxischer Markergene unter Normoxie .....	31
3.1.2	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Aktivierung von Fermentationsenzymen unter Normoxie .....	32
3.1.3	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Akkumulation von Gärungsprodukten unter Normoxie .....	34
3.2	Der Einfluss von RAP2.12 auf den Atmungsstoffwechsel bei normalem und verringertem Sauerstoffgehalt .....	38
3.2.1	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu starken Veränderungen im Metabolitprofil .....	38
3.2.2	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu verringerten Atmungsraten unter Normoxie .....	39
3.3	Der Einfluss von RAP2.12 auf Wachstum und Entwicklung bei verschiedenen Bedingungen .....	43
3.3.1	Die Korrelation von Stärkemangel und verringerter post-anoxischer Überlebensrate unter RAP2.12 Stabilisierung .....	43
3.3.2	Die Auswirkungen der RAP2.12 Stabilisierung werden mit zunehmender Tageslänge markanter .....	45
3.4	Der Einfluss von RAP2.12 auf die Photosynthese .....	48
3.4.1	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Verringerung der CO <sub>2</sub> Assimilation .....	48
3.4.2	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Verringerung der Quantenausbeute von Photosystem II .....	49
3.5	Untersuchung des Einflusses von RAP2.12 unter getrennter Beobachtung verschiedener Blattalter .....	51
3.5.1	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu verringertem Chlorophyllgehalt und oxidiertem Glutathionpool in jüngeren Blättern .....	52
3.5.2	Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu erhöhter Expression verschiedener Stressgene in jüngeren Blättern .....	54
3.5.3	Die Verringerung der Quantenausbeute von Photosystem II unter RAP2.12 Stabilisierung ist in jüngeren Blättern ausgeprägter .....	56

## INHALT

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1 Die Stabilisierung von RAP2.12 reguliert die Umstellung des Metabolismus auf hypoxische Bedingungen .....	58
4.2 Die Stabilisierung von RAP2.12 reguliert den Gärungsstoffwechsel .....	60
4.3 Die Stabilisierung von RAP2.12 beeinflusst die Zellatmung und den Energiehaushalt .....	62
4.4 Die Stabilisierung von RAP2.12 beeinflusst die Photosynthese .....	63
4.5 Die verringerten Kohlenhydratreserven unter RAP2.12 Stabilisierung beeinflussen Pflanzenwachstum und post-anoxisches Überleben.....	65
4.6 Die Stabilisierung von RAP2.12 wirkt sich stark auf die Pflanzenentwicklung aus .....	67
4.7 Fazit und Ausblick.....	70
<b>5 Anhang .....</b>	<b>73</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>Danksagungen .....</b>	<b>101</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>102</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ABI	Abscisic acid insensitive
ADH	Alkohol Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AlaAT	Alanin Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse
AOX	Alternative Oxidase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CYCB	Cyclin B
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ERFVII	Ethylene Response Factor Group VII
FG	Frischgewicht (nur in Einheiten abgekürzt)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GSH	reduzierte Form von Glutathion
GSSG	oxidierte Form von Glutathion
GSTU	Glutathion S-Transferase TAU
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	doppelt destilliertes Wasser
HB	Hemoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR	Homolog of RPW 8
HRA	Hypoxia Response Attenuator
HRU	Hypoxia-Responsive Universal Stress Protein
KO	Knockout
LDH	Laktat Dehydrogenase
MS-Medium	Murashige & Skoog-Medium
NAD(P)(H)	oxidiertes bzw. reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
PAM	Pulsamplitudenmodulation
PCO	Plant Cysteinoxidase
PDC	Pyruvat Decarboxylase
PER	Peroxidase
PSII	Photosystem II

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

qRT PCR	quantitative real time PCR
RAP2	Related to Apetala 2
RBR	Retinoblastoma related
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDH	Succinat Dehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUS	Saccharose Synthase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCP	Teosinte branched 1-cycloidea-proliferation cell factor 1
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
WEE	WEE Kinase
WT	Wildtyp

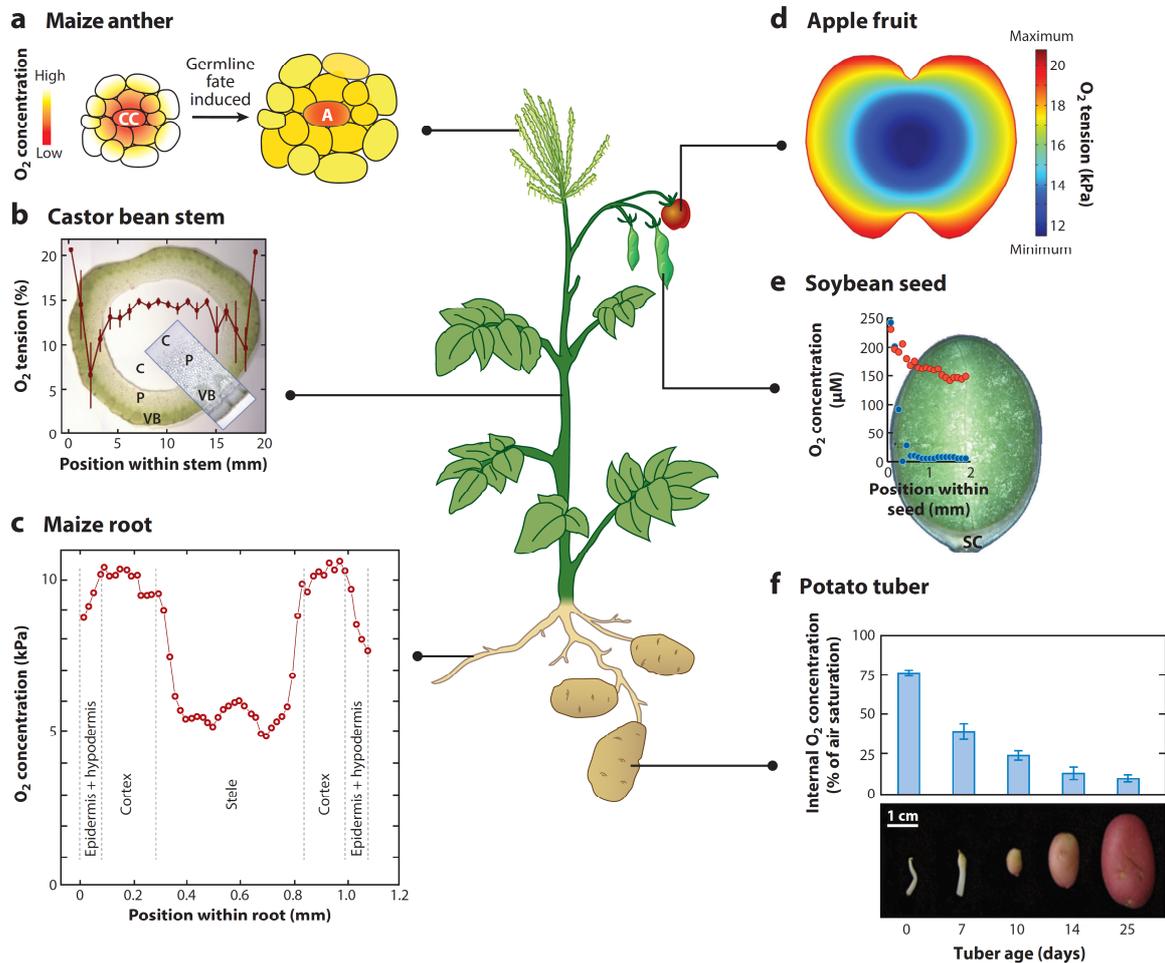
# 1 Einleitung

## 1.1 Verringerte Sauerstoffkonzentrationen in Pflanzen

Pflanzen sind sessile Organismen, die im Laufe ihrer Entwicklung verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Da diese oft von den optimalen Wachstumsbedingungen der Pflanze abweichen, spielen Mechanismen zur Adaption an die vorherrschenden Bedingungen eine wichtige Rolle für das pflanzliche Überleben. Klassische Beispiele solcher Umwelteinflüsse sind zu starke oder zu schwache Sonneneinstrahlung, Hitze oder Kälte, Trockenheit oder Überschwemmung. Die Anzahl Letzterer ist weltweit seit 1950 etwa um das Fünfzehnfache angestiegen (Bailey-Serres et al., 2012). Da Sauerstoff im Wasser etwa zehntausendmal langsamer diffundiert als in der Luft, ist die Sauerstoffversorgung für die Zellatmung der Pflanzen unter diesen Bedingungen drastisch reduziert (Bailey-Serres und Voesenek, 2008). Pflanzengewebe können Sauerstoffmangel aber auch unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) erfahren (Abbildung 1), da sie im Gegensatz zu Tieren kein aktives Sauerstofftransport-System haben. Semi-aquatische Spezies wie Reis sind in der Lage, Aerenchyme zum besseren Sauerstofftransport vom Spross in die Wurzel auszubilden, da sie an die Vernässung des Bodens angepasst sind. Die Bildung von Aerenchymen ist dabei mit gezielter Apoptose von Zellen gekoppelt und tritt in der Regel in Verbindung mit einer massiven Änderung der Wurzelarchitektur auf (Steffens und Rasmussen, 2016; Steffens et al., 2011). Die meisten Landpflanzen sind jedoch nicht in der Lage, vergleichbare Systeme zum Gasaustausch auszubilden, weshalb sie auf den passiven Sauerstofftransport durch Diffusion oder Konvektion angewiesen sind (Ho et al., 2011; Armstrong et al., 2006). Deshalb treten in metabolisch sehr aktiven Geweben wie Leitbündeln (van Dongen et al., 2003), in welchen viel Sauerstoff verbraucht wird, oder im Inneren sehr dichter Gewebe wie Kartoffelknollen, Äpfeln, Soja- und Rapssamen (Licausi et al., 2011a; Ho et al., 2010; Borisjuk und Rolletschek, 2009), in welchen die Diffusion stark beeinträchtigt ist, oft verringerte Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) auf (Abbildung 1 b, d - f). Interessanterweise wird die Sauerstoffkonzentration in manchen Pflanzenzellen auch gezielt verändert. So werden z.B. zur Entwicklung von Staubbeutel in Mais hypoxische Bedingungen gefördert (Kelliher und Walbot, 2012), was zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und in der Folge zur männlichen Keimzellentwicklung führt (Abbildung 1 a).

Komplette Abwesenheit von Sauerstoff (Anoxie) kommt in der Regel unter physiologischen Bedingungen in Pflanzen nicht vor, da steile Gefälle bezüglich der Sauerstoffkonzentration innerhalb des Pflanzengewebes ein sehr starkes

Diffusionspotenzial erzeugen, sodass Sauerstoff von Geweben mit höherer zu Geweben mit sehr niedriger Sauerstoffkonzentration diffundiert (van Dongen und Licausi, 2015).



**Abbildung 1:** Verringerte Sauerstoffkonzentrationen in verschiedenen Pflanzengeweben. Die Entwicklung von Staubbeuteln in Mais (a) erfolgt unter Erzeugung hypoxischer Bedingungen (Kelliher und Walbot, 2012). Der Stängel des Wunderbaums (b) ist zum Sauerstofftransport innen hohl, wodurch hier eine deutlich höhere Sauerstoffkonzentration vorliegt als in den außen liegenden, metabolisch sehr aktiven Leitbündeln (van Dongen et al., 2003). Ein ähnliches Bild liefert der Querschnitt einer Maiswurzel (c), wo der Cortex zum lateralen Sauerstofftransport vom Spross in die Wurzel dient (Armstrong et al., 1994). In sehr dichten Geweben wie Äpfeln (d), Sojasamen (e) und Kartoffelknollen (f) fällt der Sauerstoffgehalt graduell zum Zentrum hin bzw. über die Entwicklung betrachtet (Licausi et al., 2011a; Ho et al., 2010; Borisjuk und Rolletschek, 2009). Abbildung übernommen aus van Dongen und Licausi (2015).

## 1.2 Die Umstellung des Primärstoffwechsels unter Hypoxie

Sauerstoff ist als Substrat der Cytochrom-c Oxidase der terminale Elektronenakzeptor der mitochondrialen Elektronentransportkette. Unter Sauerstoffmangel gerät diese ins Stocken, der mitochondriale Protonengradient wird nicht in vollem Maße aufrechterhalten und folglich nimmt die Adenosintriphosphat (ATP) Produktion, welche durch oxidative

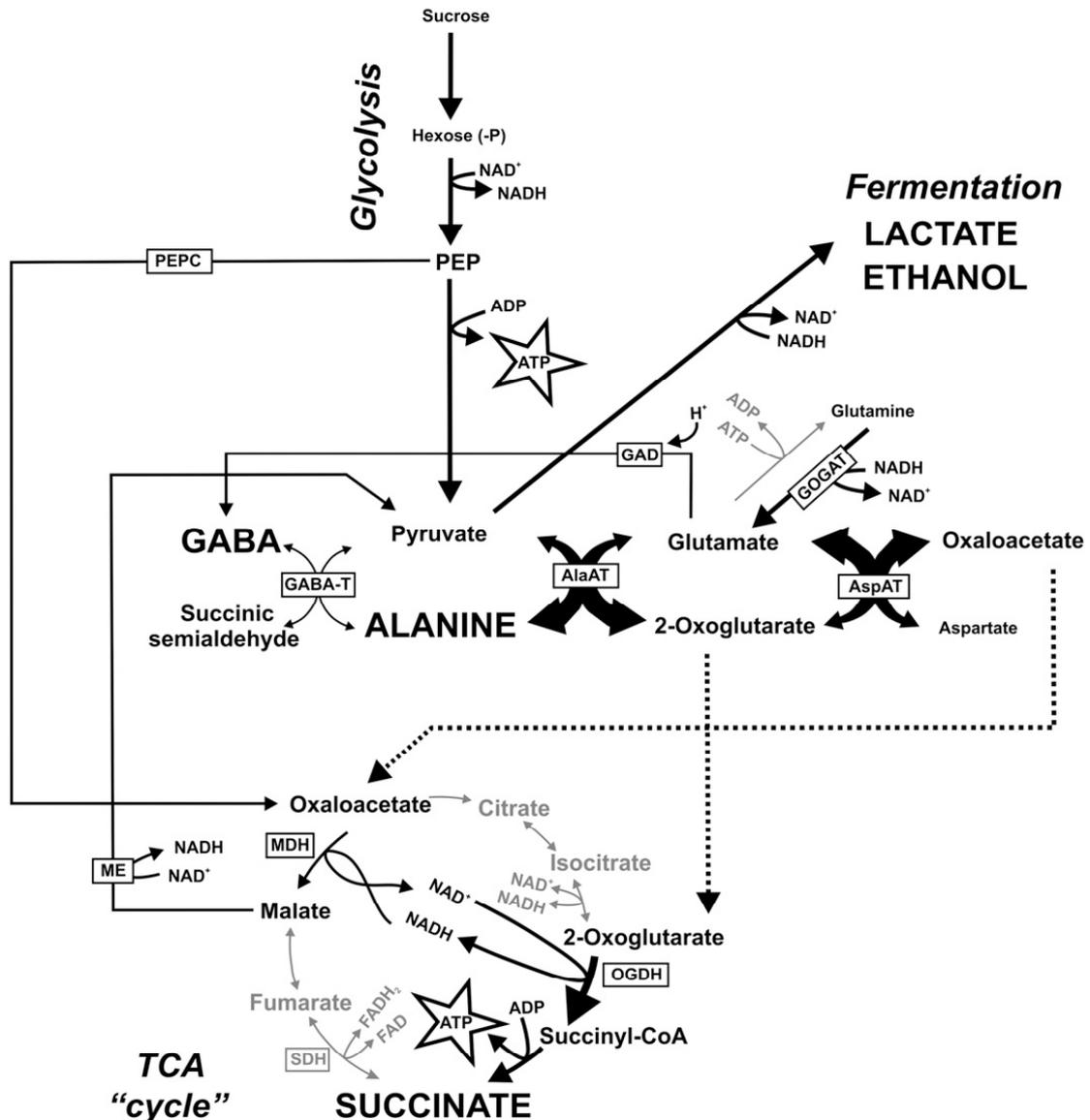
## EINLEITUNG

Phosphorylierung an der ATP Synthase vorstättengeht, deutlich ab. Die dabei entstehende Menge an ATP ist dann nicht ausreichend, um den zellulären Bedarf zu decken (van Dongen und Licausi, 2015). In der Folge wird die Glykolyse, bei der geringe Mengen an ATP entstehen, stark hochreguliert, was auch als Pasteur-Effekt bezeichnet wird. Außerdem wird der Pflanzenstoffwechsel durch mehrere Mechanismen angepasst, um weniger ATP zu verbrauchen, wobei die Umstellungen mit abnehmender Sauerstoffkonzentration vermutlich fließend stattfinden (van Dongen und Licausi, 2015). So werden z.B. die Aktivität des Speicherstoffwechsels (Geigenberger et al., 2000) sowie der Lipidsynthese (Vigeolas et al., 2003) herunterreguliert, der enzymatische Abbau von Saccharose erfolgt durch Saccharose Synthasen (SUS) anstatt durch Invertasen (Bologa et al., 2003; Zeng et al., 1999; Zeng et al., 1998; Guglielminetti et al., 1995) und Pyrophosphat-verbrauchende Stoffwechselwege werden ATP-verbrauchenden vorgezogen (Huang et al., 2008). Außerdem wird die Fermentation stark hochreguliert, um oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) als Co-Substrat für die Glykolyse zu regenerieren, wodurch die Endprodukte der Gärung, Ethanol und Laktat, akkumulieren (Abbildung 2). Laktat säuert das Cytoplasma der Zelle an, was auf viele Zellbestandteile schädlich wirken kann. Ethanol dagegen diffundiert ins extrazelluläre Milieu, wo es – außer in hohen Mengen – keine schädigenden Konsequenzen nach sich zieht (Tadege et al., 1999). Der im Ethanol gebundene Kohlenstoff steht dann in der Zelle allerdings nicht mehr zur Verfügung, weshalb durch die alkoholische Gärung die zellinternen Kohlenstoffreserven deutlich reduziert werden können (Rocha et al., 2010; Limami et al., 2008).

Eine weitere Funktion der Gärung ist es, Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse zügig zu verstoffwechseln, da es als Aktivator der Zellatmung hypoxische Bedingungen weiter fördern würde (Zabalza et al., 2009). Eine andere Methode, das entstehende Pyruvat ohne schädlichen Einfluss auf pH-Wert oder Kohlenstoffreserven umzuwandeln, ist die Produktion von Alanin durch eine gesteigerte Alanin Aminotransferase (AlaAT) Aktivität (Limami et al., 2008; Ricoult et al., 2006). Außerdem wird  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) über den „GABA shunt“ aus Glutaminsäure gebildet (Abbildung 2). Die dabei involvierte Glutamat Decarboxylase verbraucht Protonen, wodurch der durch das Laktat angesäuerte cytosolische pH-Wert wieder stabilisiert werden könnte (Bailey-Serres et al., 2012).

Als weiteres Produkt der AlaAT entsteht  $\alpha$ -Ketoglutarat, das zu Succinat umgesetzt wird. Dabei wird ein weiteres Molekül ATP gebildet (Abbildung 2). Durch die Blockierung der Succinat Dehydrogenase (SDH), welche als Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette die Aktivität dieser mit der des Citratzyklus koppelt, akkumuliert jedoch Succinat und es kommt zu einer Gabelung des Citratzyklus (António et al., 2016; Rocha et al., 2010; Vanlerberghe et al., 1989). Dabei wird das bei der Umsetzung von

$\alpha$ -Ketoglutarat entstehende NADH zu  $\text{NAD}^+$  recycelt, indem die Malat Dehydrogenase entgegen der im Citratzyklus vorgegebenen Richtung arbeitet und so Oxalacetat zu Malat umsetzt (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Modell zur Umstellung des Primärmetabolismus unter Hypoxie in *Lotus japonicus*. Zur ATP Gewinnung unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen sind die Glykolyse und in der Folge auch die Gärung stark hochreguliert, wodurch Ethanol und Laktat akkumulieren. Letztere dient der Rückgewinnung von  $\text{NAD}^+$ , ohne das die Glykolyse zum Erliegen käme, sowie der Umsetzung ihres Endprodukts Pyruvat, das durch Aktivierung der Zellatmung hypoxische Bedingungen weiter fördern würde (Zabalza et al., 2009). Durch die gesteigerte Aktivität der Alanin Aminotransferase (AlaAT) kann Pyruvat ebenfalls umgesetzt werden, wobei Alanin akkumuliert. Als weiteres Produkt dieser Reaktion entsteht  $\alpha$ -Ketoglutarat (2-Oxoglutarat), welches durch die beiden Enzyme 2-Oxoglutarat Dehydrogenase (OGDH) und Succinyl-CoA-Synthetase unter Entstehung von ATP zu Succinat umgesetzt werden kann. Dieses akkumuliert ebenfalls, da durch die Hemmung der SDH eine Gabelung des Citratzyklus auftritt. So wird das für die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat benötigte  $\text{NAD}^+$  durch die Malat Dehydrogenase (MDH) regeneriert, wobei aus Oxalacetat Malat gebildet wird. Dieser Teil des Citratzyklus arbeitet somit in rückläufiger, reduktiver Richtung. Abbildung übernommen aus Rocha et al. (2010).

### 1.3 Transkriptionelle Regulation und ERFVII Transkriptionsfaktoren

#### 1.3.1 Der Einfluss von Hypoxie auf die Transkription

Hypoxie bewirkt eine massive Umstellung der pflanzlichen Transkription (Narsai et al., 2011; Mustroph et al., 2009; van Dongen et al., 2009; Liu et al., 2005; Klok et al., 2002). Da in verschiedenen Publikationen unterschiedliche Zeiträume und Sauerstoffkonzentrationen verwendet wurden, zeigten sich je nach Studie mehrere hundert bis tausend unterschiedlich exprimierte Gene nach der hypoxischen Behandlung. Die Einteilung in funktionelle Kategorien zeigte dabei eine gesteigerte Expression von Genen für Glykolyse und Fermentation, Ethylensynthese und -perzeption, transkriptionelle Regulation, Photosynthese, Kohlenhydratmetabolismus und Proteindegradation, wohingegen die Genexpression in Verbindung mit Zellwand, Sekundärmetabolismus, Wasser- und Ionenkanälen verringert war (Narsai et al., 2011; Liu et al., 2005). Bei Betrachtung der zeitlichen Komponente wurde festgestellt, dass dabei in den ersten 30 Minuten hauptsächlich die Expression von Genen, die für Transkriptionsfaktoren sowie für Komponenten der Signaltransduktion kodieren, verändert war (Klok et al., 2002). Außerdem führte schon eine leichte Verringerung der Sauerstoffkonzentration zu einem Rückgang der Genexpression für Proteine, die in energieverbrauchenden Prozessen eine Rolle spielen (van Dongen et al., 2009).

Mustroph et al. (2009) untersuchten 21 verschiedene Zelltypen von *Arabidopsis thaliana* und konnten dabei zeigen, dass unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen in all diesen die Expression von 49 charakteristischen Genen verändert wurde, welche daraufhin als zentrale Genantwort auf Hypoxie definiert wurden. Unter ihnen waren einige Gene, deren Wichtigkeit unter Hypoxie schon vorher bekannt war (Bieniawska et al., 2007; Hunt et al., 2002; Rahman et al., 2001; Ellis et al., 1999), wie z.B. *ADH1* als Gen für die Hauptisoform der Alkohol Dehydrogenase (ADH), *HEMOGLOBIN 1 (HB1)* sowie die Gene der beiden SUS Isoformen *SUS1* und *SUS4*. Des Weiteren konnten Banti et al. (2008) zeigen, dass eine Vorbehandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit Hitze (38 °C) direkt vor der anoxischen Behandlung zu deutlich gesteigerten post-anoxischen Überlebensraten führte. Die Überschneidung der genetischen Antworten auf Anoxie und Hitze liegt dabei z.B. am Transkriptionsfaktor Heat shock factor A2, welcher unter beiden Stressarten stark induziert wird (Banti et al., 2010).

Neben der Transkription unterliegt auch die Translation deutlichen Änderungen unter Hypoxie. So verringert sich für viele mRNAs eher die Polysombeladung, die eng mit dem zellulären ATP Gehalt zusammenhängt, als die Expression der entsprechenden Gene (Branco-Price et al., 2008; Branco-Price et al., 2005) und translational reprimierte mRNAs werden aggregiert (Sorenson und Bailey-Serres, 2014).

### 1.3.2 ERFVII Transkriptionsfaktoren und ihre sauerstoffabhängige Stabilität

Eine bedeutende Rolle für die transkriptionelle Umstellung unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen spielen Ethylene Response Factor Group VII (ERFVII) Transkriptionsfaktoren, eine Untergruppe der ERF/APETALA2 Familie der Transkriptionsfaktoren (Sakuma et al., 2002). Der erste Vertreter, mit dem der Zusammenhang zwischen ERFVII Transkriptionsfaktoren und der Genregulation unter Hypoxie gezeigt werden konnte, war SUBMERGENCE 1A in Sturzflut-toleranten Reispflanzen (Xu et al., 2006) (siehe auch 1.4). In *Arabidopsis* gibt es fünf Mitglieder der ERFVII Transkriptionsfaktoren: RELATED TO APETALA 2.2 (RAP2.2), RAP2.3 und RAP2.12 sowie HYPOXIA RESPONSIVE ERF 1 und 2 (HRE1 und HRE2). Die ersten drei werden in *Arabidopsis*-Zellen konstitutiv und ubiquitär exprimiert (van Dongen und Licausi, 2015) und zeigen eine stärkere Aktivierungskapazität für anaerobe Promotoren als HRE1 und HRE2, welche nicht eigenständig in der Lage sind, die Promotoren zu aktivieren (Bui et al., 2015). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass RAP2.2 und RAP2.12 sowie in verringertem Maße RAP2.3 die zentrale Genantwort auf Hypoxie redundant initiieren, wodurch auch die Expression der Transkriptionsfaktoren HRE1 und HRE2 hochreguliert wird, welche die Genantwort weiter aufrecht erhalten, sofern die hypoxischen Bedingungen andauern (Gasch et al., 2016; Bui et al., 2015; Licausi et al., 2010).

Die konstitutive Expression von RAP2.2, RAP2.3 und RAP2.12 stellt sicher, dass die Genexpression der Zelle sofort auf die verringerten Sauerstoffkonzentrationen eingestellt werden kann. Dass dies aber nur unter Hypoxie passiert, wird durch den proteasomalen Abbau der ERFVII Transkriptionsfaktoren im N-end rule pathway (NERP) unter normoxischen Bedingungen sichergestellt (Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011) (Abbildung 3). Dafür haben alle fünf ERFVII Vertreter die charakteristische N-terminale Sequenz MCGGA (Bailey-Serres et al., 2012; Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011), wobei das Cystein an vorletzter Stelle für den NERP-abhängigen Abbau entscheidend ist. So wird zunächst das Methionin durch Methionin Aminopeptidasen abgespalten, wodurch das Cystein am N-Terminus exponiert wird. Liegt eine ausreichende Konzentration an Sauerstoff in der Zelle vor, wird das Cystein von Plant Cysteinoxidasen (PCO) oxidiert (White et al., 2017; Weits et al., 2014). Die dabei entstehende Cystein Sulfinsäure wird im Anschluss durch Arginyl tRNA Transferasen arginyliert (Graciet et al., 2009), was wiederum ein Erkennungssignal für die N-end rule E3 Ligase PROTEOLYSIS 6 darstellt (Garzón et al., 2007). Diese ubiquitiniert das abzubauen Protein im nahegelegenen Lysin-Bereich, wodurch es letztlich vom 26S Proteasom erkannt und degradiert wird (Hanna und Finley, 2007) (Abbildung 3).

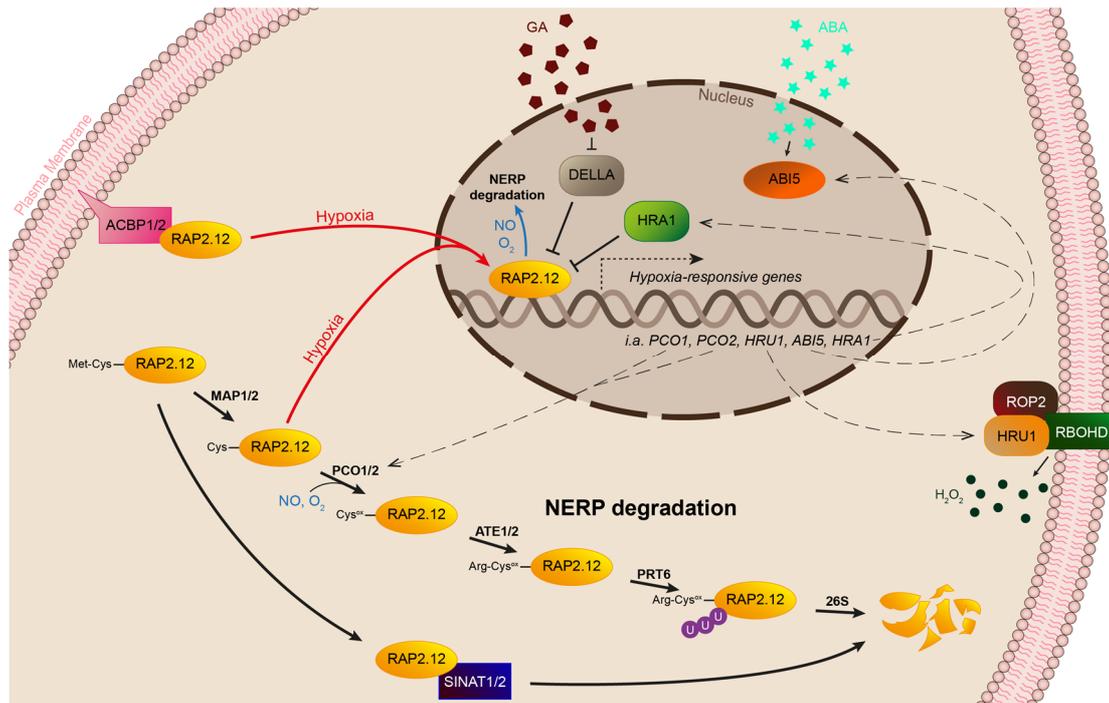
Die Anwesenheit von Stickstoffmonoxid trägt ebenfalls zur Destabilisierung der ERFVII Transkriptionsfaktoren bei, da es auch an der Oxidation des exponierten Cysteins beteiligt ist (Vicente et al., 2017; Gibbs et al., 2014). Stickstoffmonoxid wird in Pflanzenzellen hauptsächlich durch die Aktivität der Nitratreduktase produziert (Chamizo-Ampudia et al., 2017). Unter abiotischen Stressbedingungen nimmt die Enzymaktivität stark ab, was zu einer deutlich reduzierten Menge an Stickstoffmonoxid und einer Stabilisierung der ERFVII Transkriptionsfaktoren führt (Vicente et al., 2017). Interessanterweise wird Stickstoffmonoxid zudem durch HB1 zu Nitrat umgesetzt. Die Genexpression für dieses Enzym wird unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen stark angeregt, sie zählt sogar zur zentralen Genantwort auf Hypoxie (Mustroph et al., 2009) (siehe 1.3.1). Das bedeutet, dass die Stickstoffmonoxid Konzentration unter diesen Bedingungen weiter reduziert wird (Dordas et al., 2003), was zur Stabilisierung der ERFVII Transkriptionsfaktoren beiträgt, welche in einer Feedforward-Kopplung die zentrale Genantwort auf Hypoxie weiter aktivieren. Zusätzlich verbraucht die Umsetzung von Nitrit über Stickstoffmonoxid zu Nitrat NADH, wodurch unabhängig von der Gärung  $\text{NAD}^+$  für die Glykolyse regeneriert wird (van Dongen und Licausi, 2015; Igamberdiev und Hill, 2004).

Ein Teil der konstitutiv exprimierten RAP2.12 Transkriptionsfaktoren wird über Acyl-CoA Bindeproteine an der Plasmamembran stabilisiert, wo es N-terminal vor dem proteasomalen Abbau durch den NERP geschützt ist (Licausi et al., 2011b) (Abbildung 3). Fällt die Sauerstoffkonzentration unter 10 %, transloziert RAP2.12 in den Kern (Kosmacz et al., 2015), wo es die hypoxische Genexpression induziert. Sobald die Sauerstoffkonzentration in der Zelle wieder steigt, wird RAP2.12 durch den NERP abgebaut und damit die hypoxische Genexpression wieder abgeschaltet (Kosmacz et al., 2015; Licausi et al., 2011b). Durch die sauerstoffabhängige Stabilisierung der ERFVII Transkriptionsfaktoren wird somit eine dynamische Anpassung der Genexpression an die vorherrschenden Sauerstoffkonzentrationen gewährleistet.

ERFVII Transkriptionsfaktoren können neben dem Abbau durch den NERP aber auch unabhängig von der zellulären Sauerstoffkonzentration abgebaut werden. So können z.B. die REALLY INTERESTING NEW GENE E3 Ligasen SEVEN IN ABSENTIA OF ARABIDOPSIS 1 und 2 RAP2.12 ebenfalls durch Polyubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markieren (Papdi et al., 2015) (Abbildung 3). Die genauen Hintergründe sind dazu noch unklar, könnten aber mit der Perzeption verringerter Nährstoffgehalte zusammenhängen (Giuntoli und Perata, 2018; Qi et al., 2017).

Neben ihrer Schlüsselrolle in der Genregulation unter Hypoxie kristallisiert sich für ERFVII Transkriptionsfaktoren außerdem zunehmend heraus, dass diese Transkriptionsfaktoren auch die Resistenz von Pflanzen bei anderen Stressarten erhöhen, wie z.B. Hochlicht, Hitze, Trockenheit oder Salzstress (Vicente et al., 2017; Yao et al., 2017).

## EINLEITUNG



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung von Prozessen in der Pflanzenzelle in Verbindung mit RAP2.12. Der ERFVII Transkriptionsfaktor RAP2.12 wird bei Normoxie in der Zelle über Acyl-CoA Bindeproteine (ACBP) an der Plasmamembran gebunden (Licausi et al., 2011b), was ihn vor dem proteasomalen Abbau schützt. Denn liegt der N-Terminus des Transkriptionsfaktors frei vor, wird das N-terminale Methionin von Methionin Aminopeptidasen (MAP) abgespalten und das daraufhin exponierte Cystein unter Verfügbarkeit von hohen Stickstoffmonoxid-Konzentrationen oder genügend Sauerstoff oxidiert, wobei Letzteres von Plant Cysteinoxidasen (PCO) katalysiert wird (Weits et al., 2014). Die oxidierte Form wird von Arginyl tRNA Transferasen (ATE) erkannt, woraufhin das Cystein arginyliert wird. Das wird wiederum von der N-end rule E3 Ligase PROTEOLYSIS 6 (PRT6) erkannt, welche den Transkriptionsfaktor durch Polyubiquitinierung zum Abbau im 26S Proteasom (26S) markiert (Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011). Da der Abbauweg des Proteins maßgeblich von der Beschaffenheit des N-Terminus abhängt, heißt er N-end rule pathway (NERP) (Bachmair et al., 1986). Allerdings kann der Transkriptionsfaktor auch unabhängig vom NERP abgebaut werden, indem z.B. SEVEN IN ABSENCE OF ARABIDOPSIS (SINAT) E3 Ligasen das Protein ubiquitinieren, welches daraufhin degradiert wird (Papdi et al., 2015). Unter Hypoxie erfolgt die Translokation von RAP2.12 in den Nucleus, wo es als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl an Genen zur Hypoxieantwort reguliert. Unter ihnen sind auch Gene, die der Feedback Regulation von RAP2.12 dienen, wie *PCO1*, *PCO2* sowie das Gen für HYPOXIA RESPONSIVE ATTENUATOR 1 (*HRA1*), welches im Zellkern antagonistisch zu RAP2.12 wirkt (Giuntoli et al., 2014). Außerdem wird die Transkription für HYPOXIA RESPONSIVE UNIVERSAL STRESS PROTEIN 1 (*HRU1*) hochreguliert. Das Protein *HRU1* interagiert mit der GTPase RHO-like small G protein of plants 2 (*ROP2*) und der NADPH-Oxidase RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN D (*RBOHD*) an der Plasmamembran, wodurch die Produktion von ROS in Form von  $H_2O_2$  reguliert wird (Gonzali et al., 2015). Des Weiteren wird die Expression des Transkriptionsfaktors ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (*ABI5*) erhöht, wodurch die Sensitivität der Genexpression für das Phytohormon Abscisinsäure (*ABA*) gesteigert wird (Gibbs et al., 2014; Holdsworth et al., 2008). Ebenfalls über Phytohormone, in Form von Gibberellinsäure (*GA*), werden *DELLA* Proteine gesteuert, welche antagonistisch zu RAP2.12 wirken (Marín-de la Rosa et al., 2014). Insgesamt stellt die Regulation von RAP2.12 somit ein sehr dynamisches System dar, welches flexibel auf die vorherrschenden Sauerstoffbedingungen in der Zelle reagiert. Diese Dynamik gilt auch für die anderen ERFVII Transkriptionsfaktoren *RAP2.2*, *RAP2.3*, *HRE1* und *HRE2*, deren Stabilität ebenfalls über den NERP reguliert ist (Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011).

### 1.3.3 Die Interaktionspartner von RAP2.12

Die Umstellung des Pflanzenmetabolismus auf hypoxische Bedingungen ist energetisch äußerst ungünstig und kostet viele Ressourcen der Zelle, z.B. in Form von Kohlenhydraten (siehe 1.2). Somit ist das dynamische, sauerstoffabhängige System zur Aktivierung und Deaktivierung der hypoxischen Genexpression über den NERP von enormer Wichtigkeit (siehe 1.3.2). Dies wird dadurch unterstrichen, dass RAP2.12 die Expression von *PCO1* und *PCO2* aktiviert (Weits et al., 2014), wodurch eine Feedback Schleife zur erhöhten Sauerstoffsensitivität des NERP und zum sofortigen Abbau der ERFVII Transkriptionsfaktoren bei Reoxygenierung gebildet wird (Abbildung 3). Außerdem aktiviert RAP2.12 die Expression seines Antagonisten HYPOXIA RESPONSE ATTENUATOR 1 (*HRA1*; Abbildung 3) (Giuntoli et al., 2014). *HRA1* ist ein Trihelix-Transkriptionsfaktor, der aber nur an wenige hypoxische Promotoren bindet. Stattdessen interagiert er direkt mit RAP2.12 auf Protein-Ebene, wodurch die Aktivität von RAP2.12 gemindert und somit die hypoxische Genexpression reduziert wird. Dadurch gleicht *HRA1* eine Überreaktion der Genexpression auf hypoxische Bedingungen aus. Gleichzeitig bindet *HRA1* aber auch an den eigenen Promotor, um die weitere Aktivierung der *HRA1* Expression durch RAP2.12 zu verringern. Durch diese negative Feedback-Schleife wird die Reaktionsfähigkeit der Genexpression auf anhaltende Hypoxie erhalten, indem weiteren RAP2.12 Transkriptionsfaktoren nicht zu stark entgegengewirkt wird (Giuntoli et al., 2014). Weitere Antagonisten von RAP2.12 sind DELLA Proteine (Marín-de la Rosa et al., 2014) (Abbildung 3). Diese Regulatoren der Genexpression binden ebenfalls physikalisch an Transkriptionsfaktoren wie z.B. RAP2.3 und RAP2.12, um deren Aktivität zu verhindern. In Anwesenheit des Phytohormons Gibberellinsäure werden DELLA Proteine durch das 26S Proteasom abgebaut, wodurch RAP2.12 als Transkriptionsfaktor aktiv sein kann (Marín-de la Rosa et al., 2014).

RAP2.12 aktiviert auch die Expression von HYPOXIA-RESPONSIVE UNIVERSAL STRESS PROTEIN 1 (*HUR1*) (Gonzali et al., 2015) und von RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D (*RBOHD*) (Yao et al., 2017). *HUR1* interagiert unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen mit der GTPase ROP2 (RHO-like small G protein of plants 2) und der NADPH-Oxidase *RBOHD* an der Plasmamembran, wodurch die Produktion von ROS in Form von  $H_2O_2$  reguliert wird (Gonzali et al., 2015) (Abbildung 3). Dieser oxidative Stoß zu Beginn des hypoxischen Stresses wurde schon mehrfach beobachtet (Gonzali et al., 2015; Banti et al., 2010; Baxter-Burrell et al., 2002) und induziert wahrscheinlich die Aktivierung einer stressbedingten Genexpression durch Heat shock factor (siehe 1.3.1) und ROS-abhängige Transkriptionsfaktoren (Pucciariello und Perata, 2017).

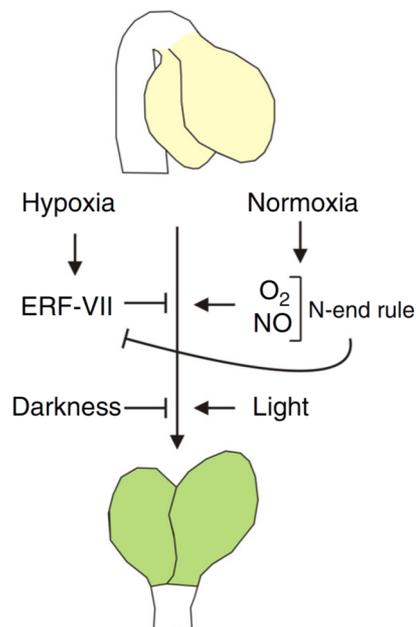
#### 1.4 Auswirkungen von Hypoxie auf die Pflanzenentwicklung

Verringerte Sauerstoffkonzentrationen wirken sich nicht nur auf zellulärer Ebene aus, sondern können auch die Pflanzenentwicklung beeinflussen. Ein sehr prominentes Beispiel dafür ist Reis. Reispflanzen sind in der Lage, durch Aerenchym-Bildung den Sauerstofftransport in die Wurzel zu verbessern (siehe 1.1). Außerdem lassen sich an ihnen auch verschiedene Überlebensstrategien bei Überschwemmung aufzeigen (Nagai et al., 2010). In Tiefwasserreis-Sorten steigt z. B. das Streckungswachstum der Internodien als Reaktion auf Überschwemmung, damit die Blätter über der Wasseroberfläche bleiben und so die Pflanzen mit Sauerstoff und in der Photosynthese erzeugten Kohlenhydraten versorgt werden können (Bailey-Serres und Voeselek, 2008). Diese Vermeidungsstrategie ist vor allem bei einer langsam fortschreitenden Flut wirkungsvoll und wird durch die beiden ERFVII Transkriptionsfaktoren SNORKEL1 und SNORKEL2 gesteuert (Hattori et al., 2009). Im Gegensatz dazu legen Sturzflut-tolerante Reissorten bei Überschwemmung einen Wachstumsarrest ein, um Ressourcen zu schonen und so nach der Überflutung Kapazitäten für das weitere Wachstum zu haben (Fukao et al., 2006). Diese Durchhaltestrategie wird von SUBMERGENCE 1A, ebenfalls einem ERFVII Transkriptionsfaktor, reguliert (Xu et al., 2006). Dabei führt ein komplexes Zusammenspiel von Ethylen, Abscisinsäure (ABA), Gibberellinsäure und den verschiedenen ERFVII Transkriptionsfaktoren zu den gegensätzlichen Reaktionen der verschiedenen Reissorten bei Überflutung (Voeselek und Bailey-Serres, 2009).

In *Arabidopsis* fördern ERFVII Transkriptionsfaktoren die Genexpression für den Transkriptionsfaktor ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5; siehe Abbildung 3) (Gibbs et al., 2014), der die Samenkeimung negativ reguliert (Lopez-Molina et al., 2001). ABI5 erhöht dabei die Sensitivität für ABA (Abbildung 3), wodurch bei Anwesenheit des Phytohormons unter Hypoxie die Samenruhe beibehalten wird. Steigt die Konzentration von Sauerstoff oder Stickstoffmonoxid in der Zelle, werden die ERFVII Transkriptionsfaktoren durch den NERP abgebaut, die Expression von ABI5 und die Sensitivität für ABA sinken und die Samenruhe wird durchbrochen (Gibbs et al., 2014). Zudem wurde von Vicente et al. (2017) mit der Chromatin-umstrukturierenden ATPase BRAHMA kürzlich eine weitere Komponente im Zusammenspiel von ERFVII und ABI5 Transkriptionsfaktoren identifiziert. BRAHMA konkurriert mit den ERFVII Transkriptionsfaktoren um den Promotor von *ABI5*, wobei es diesen bei Bindung reprimiert und so die Keimung fördert (Han et al., 2012). RAP2.12 und RAP2.3 können aber auch physikalisch an BRAHMA binden (Vicente et al., 2017). Diese gegensätzliche Regulierung von ABI5 und der ABA Sensitivität durch die ERFVII Transkriptionsfaktoren und BRAHMA stellt somit ein dynamisches System dar, das die Pflanzenentwicklung an die vorherrschende Sauerstoffkonzentration anpasst (Vicente et al., 2017).

## EINLEITUNG

Das Zusammenspiel von ERFVII Transkriptionsfaktoren, DELLA Proteinen und Gibberellinsäure (siehe 1.3.3 und Abbildung 3) wurde kürzlich im Zusammenhang mit der Formation des apikalen Hakens etiolierter Keimlinge untersucht (Abbas et al., 2015; Abbas et al., 2013), welcher die Stammzellnische vor Beschädigungen schützt, während der Keimling durch die Erde an die Oberfläche wächst. Die beiden Phytohormone Gibberellinsäure und Ethylen sind dabei maßgeblich an der Bildung und Aufrechterhaltung des apikalen Hakens beteiligt, wohingegen DELLA Proteine diesem entgegenwirken (Abbas et al., 2013). Des Weiteren konnten Abbas et al. (2015) zeigen, dass auch die Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren für die Aufrechterhaltung des apikalen Hakens vonnöten ist. Durch Dunkelheit und hypoxische Bedingungen in nasser Erde sammelt sich Ethylen in den Keimlingen an und die ERFVII Transkriptionsfaktoren werden stabilisiert. Außerdem verhindert die Akkumulation von Gibberellinsäure die Aktivität von DELLA Proteinen, welche die ERFVII Transkriptionsfaktoren inhibieren würden (siehe 1.3.3 und Abbildung 3). Die ERFVII Transkriptionsfaktoren unterdrücken zudem die Biosynthese von Chlorophyll (Abbas et al., 2015). Erst bei Erreichen der Erdoberfläche wird der NERP durch die höhere Menge an Sauerstoff aktiv, die ERFVII Transkriptionsfaktoren werden abgebaut und die Photomorphogenese des Keimlings beginnt (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Die Rolle von ERFVII Transkriptionsfaktoren während der Photomorphogenese. In nasser Erde herrschen hypoxische Bedingungen und Dunkelheit, wodurch die ERFVII Transkriptionsfaktoren stabilisiert werden und die Öffnung des apikalen Hakens sowie die Chlorophyllsynthese hemmen (Abbas et al., 2015). Sobald der Keimling aber die Erdoberfläche durchbricht, wo ausreichende Sauerstoffkonzentrationen vorliegen, werden die ERFVII Transkriptionsfaktoren durch den NERP abgebaut und dadurch die Photomorphogenese initiiert. Abbildung übernommen aus Schippers et al. (2016).

## 1.5 Hintergründe und Ziele der Arbeit

### 1.5.1 Widersprüchliche Ergebnisse bisheriger Studien

Im Jahr 2011 wurden zeitgleich zwei Studien veröffentlicht, in welchen die NERP-abhängige Stabilität der ERFVII Transkriptionsfaktoren und damit die Sauerstoff-abhängige Steuerung der hypoxischen Genexpression nachgewiesen wurde (Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011). Licausi et al. (2011b) arbeiteten dabei hauptsächlich mit zwei RAP2.12 Überexpressionslinien, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12. Während in 35S::RAP2.12 Pflanzen das vollständige *RAP2.12* Gen überexprimiert wurde, was ihnen eine schnellere Induktion der hypoxischen Genexpression und daraus resultierend eine höhere Überlebensrate nach Überschwemmung vermittelte (Licausi et al., 2011b), waren in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen die ersten 13 N-terminalen Aminosäuren des überexprimierten Proteins deletiert. Da letztere die Erkennungssequenz für den NERP-abhängigen Abbau beinhalten (siehe 1.3.2), wurde der Transkriptionsfaktor durch die Deletion auch bei Normoxie stabilisiert. Das führte zu einer konstitutiv aktivierten hypoxischen Genexpression in diesen Pflanzen, überraschenderweise aber trotzdem zu einer verminderten post-hypoxischen Überlebensrate (Licausi et al., 2011b). Dies galt auch für die NERP Knockout (KO)-Mutanten *prt6* und *ate1ate2*, in welchen ERFVII Transkriptionsfaktoren ebenfalls unabhängig von der Sauerstoffkonzentration stabilisiert wurden (Licausi et al., 2011b). Im Gegensatz dazu publizierten Gibbs et al. (2011) jedoch, dass *prt6* und *ate1ate2* Pflanzen eine höhere Überlebensrate nach hypoxischer Behandlung aufwiesen. Die Ergebnisse widersprachen sich also hinsichtlich der Frage, ob sich die konstitutive Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren positiv oder negativ auf das post-hypoxische Überleben der Pflanzen auswirkte.

Da sich der Versuchsaufbau der beiden Studien stark unterschied, wurden mehrere Gründe zur Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse diskutiert, wie z.B. Unterschiede in den hypoxischen Behandlungen, in den Entwicklungsstadien der Pflanzen oder in den Wachstumsbedingungen bezüglich der relativen Luftfeuchtigkeit und der Verfügbarkeit bzw. Abwesenheit von Saccharose im Anzuchtmedium (Riber et al., 2015; Bailey-Serres et al., 2012; Sasidharan und Muströph, 2011). Neben den Auswirkungen all dieser Faktoren, die das post-hypoxische Überleben von Pflanzen beeinflussen können, blieb jedoch eine weitere grundsätzliche Frage ungeklärt: Führt die konstitutive Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren in den Pflanzen nur zur Umstellung der Genexpression auf hypoxische Bedingungen, was schon mehrfach gezeigt wurde (Bui et al., 2015; Kosmacz et al., 2015; Giuntoli et al., 2014; Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011), oder folgt auf die hypoxische Genexpression auch eine konstitutive, energetisch ungünstige (siehe 1.2) Umstellung des Metabolismus auf verringerte Sauerstoffkonzentrationen?

### 1.5.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des ERFVII Transkriptionsfaktors RAP2.12 in der Regulation des Pflanzenmetabolismus in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Dafür wurden die beiden repräsentativen Überexpressionslinien 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 (Licausi et al., 2011b) (siehe 1.5.1) vergleichend zum Wildtyp (WT) betrachtet.

(i) Der Einfluss von RAP2.12 auf den Stoffwechsel, vor allem den Gärungs- und Atmungsstoffwechsel, wurde unter Normoxie und Hypoxie untersucht. Dies erfolgte durch die Analyse verschiedener Enzymaktivitäten, die Quantifizierung von Metaboliten und die Bestimmung von Atmungsraten.

(ii) Eine der Thesen zur Erklärung der widersprüchlichen Ergebnisse von Gibbs et al. (2011) und Licausi et al. (2011b) (siehe 1.5.1) wurde überprüft: Da sich im Metabolitprofil der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen ein Mangel an Kohlenhydratreserven abzeichnete, wurde die Abhängigkeit des post-anoxischen Überlebens von Saccharose im Medium getestet.

(iii) Die Ursache für den Mangel an Kohlenhydratreserven unter konstitutiver RAP2.12 Stabilisierung wurde analysiert. Dazu wurden Experimente zum Wachstum der Pflanzen unter verschiedenen Belichtungsdauern sowie zur photosynthetischen Aktivität durchgeführt.

(iv) Die Blattentwicklung adulter Pflanzen wurde untersucht. Da die phänotypische Analyse von 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen Hinweise auf Defekte in der Entwicklung junger Blätter lieferte, wurde diese durch Messungen zum Chlorophyllgehalt, zum Redoxstatus des Glutathionpools sowie zu Markergenen der Zellzyklusregulation genauer beleuchtet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenlinien und Wachstumsbedingungen

#### 2.1.1 Verwendete Linien

Für alle Versuche wurden Pflanzen der Brassicaceen-Art *Arabidopsis thaliana* (LINNAEUS) HEYNHOLD verwendet. Als WT-Kontrolle diente der Ökotyp *Columbia-0*, in dessen genetischem Hintergrund auch die beiden repräsentativen Überexpressionslinien 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 vorlagen. Diese wurden von Licausi et al. (2011b) charakterisiert und publiziert. Das Samenmaterial der Überexpressionslinien wurde von Prof. Dr. Francesco Licausi (Scuola Superiore Sant'Anna Pisa) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Anzucht auf Erde

Zur Anzucht von Pflanzen auf Erde wurden die Samen zunächst für 7 - 10 Tage zur Keimung auf sterilen Agarplatten (2 % Phytoagar in 1/2 Murashige & Skoog-Medium (MS-Medium) pH 5,7/KOH) ausgelegt. Dafür wurden sie auf eine der beiden folgenden Arten sterilisiert. Entweder wurden die Samen für 5 min in 70 % Ethanol mit 0,1 % Tween 20 geschüttelt, einmal mit autoklaviertem, doppelt destilliertem Wasser ( $H_2O_{\text{bidest}}$ ) gewaschen, für 5 min in 6 % Natriumhypochlorit mit 0,1 % Tween 20 geschüttelt und anschließend fünfmal mit autoklaviertem  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen. Oder die Sterilisation erfolgte durch Schütteln der Samen in 70 % Ethanol mit 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS) für 7 min, in 100 % Ethanol für 7 min und viermaliges Waschen der Samen in autoklaviertem  $H_2O_{\text{bidest}}$ . Anschließend wurden sie auf den Agarplatten ausgelegt, wobei für Samen der Linien 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin in den Platten enthalten waren. Um die Samen zu stratifizieren, wurden die Platten zunächst für 2 - 3 Tage im Dunkeln bei 4°C gelagert, bevor sie in eine Sterilkammer (16 h Tag bei  $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 22 °C; 8 h Nacht bei  $0 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 18 °C) gebracht wurden. Tolerante Pflanzen von Kanamycin-Agarplatten wurden nach 7 Tagen auf Erde umgesetzt, ebenso wie WT Pflanzen von Platten ohne Antibiotika-Zugabe. Die Pflanzen wuchsen dann in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen (8 h Tag bei  $160 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 20 °C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit; 16 h Nacht bei  $0 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 16 °C, 70 % relative Luftfeuchtigkeit) in der Regel bis zu einem Alter von 5 Wochen. Ausnahmen bezüglich des Pflanzenalters wurden in den Abbildungen entsprechend kenntlich gemacht.

Für die Dokumentation des Pflanzenwachstums (siehe 2.2) wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf die Keimung auf Agarplatten verzichtet. Die Samen, welche zuvor auf Homozygotie getestet wurden, wurden für 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C auf feuchtem Filterpapier stratifiziert und danach direkt auf Erde ausgelegt. Die entsprechenden Pflanzschalen wurden in einen Klimaschrank (Percival Scientific, Perry, USA) bei verschiedenen Wachstumsbedingungen (4 h / 8 h / 24 h Tag bei 160  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 20 °C) gebracht und für die Zeit der Keimung zusätzlich mit einer luftdurchlässigen Haube abgedeckt.

### 2.1.3 Anzucht auf Agarplatten

Für die Anzucht von Pflanzen in Sterilkultur auf Agarplatten wurden die Samen zunächst wie unter 2.1.2 sterilisiert. Anschließend wurden sie abhängig vom jeweiligen Experiment auf unterschiedliche Agarplatten ausgebracht: Zur Überprüfung der post-anoxischen Überlebensrate wurden jeweils 20 Samen einzeln auf jede Platte ausgelegt, wobei die Agarkonzentration 0,8 % in 1/2 MS-Medium (pH 5,7/KOH) betrug. Sollte das Pflanzenmaterial z.B. für Metabolitmessungen geerntet werden, wurden etwa 200 - 300 Samen in einer Linie auf eine 2 % Agarplatte (in 1/2 MS-Medium pH 5,7/KOH) ausgebracht. Für die Anzucht von Samen der Linien 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 enthielten die Platten zusätzlich 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin. Außerdem wurde je eine Hälfte der Agarplatten mit 30 mM Saccharose versetzt, während die andere Hälfte der Platten keinen Zuckerzusatz enthielten. Die Samen wurden auf den Platten für 2 - 3 Tage bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert und die Pflanzen dann für eine Woche unter Langtagbedingungen in der Sterilkammer (siehe 2.1.2) angezogen, wobei die 0,8 % Agarplatten horizontal und die 2 % Agarplatten vertikal positioniert waren. Die Wuchsrichtung war dabei für die spätere Verwendung bzw. Ernte wichtig.

### 2.1.4 Anzucht in Halbflüssigkultur

Für die Isolation von Mitochondrien wurden Pflanzen in sterilen Halbflüssigkulturen nach der Methode von Morgan et al. (2008) verwendet. Dazu wurden die Samen wie unter 2.1.2 sterilisiert und anschließend auf die Oberfläche des halbflüssigen Mediums (0,25 - 0,3 % Microagar und 30 mM Saccharose in MS-Medium pH 5,8/KOH) in sterilen, verschließbaren Gläsern aufgebracht. Die Samen wurden in den Gläsern für 2 Tage bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert und die Pflanzen dann für 12 Tage in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (siehe 2.1.2) angezogen.

### 2.1.5 Anzucht in Mikrotiterplatten

Die Anzucht von Pflanzen in sterilen Flüssigkulturen in Mikrotiterplatten erfolgte ausschließlich für die Quantifizierung von Ethanol. Die Samen wurden zunächst wie unter 2.1.2 sterilisiert und anschließend in eine 24er Mikrotiterplatte ausgebracht, wobei pro Napf etwa 10 Samen in 400 µl Nährlösung (30 mM Saccharose in 1/2 MS-Medium pH 5,7/KOH) überführt wurden. Die Mikrotiterplatten wurden verschlossen und zur Stratifikation der Samen für 2 Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für eine Woche in der Sterilkammer unter Langtagbedingungen (siehe 2.1.2), wobei nur die Wurzeln im Nährmedium blieben, die Blätter jedoch aus der Lösung herausragten.

## 2.2 Dokumentation des Pflanzenwachstums

### 2.2.1 Pflanzenentwicklung nach BBCH

Das Samenmaterial wurde wie unter 2.1.2 beschrieben auf Erde ausgebracht und die Entwicklung der Pflanzen nach dem BBCH-Index für Unkräuter (Hess et al., 1997) jeden dritten bis vierten Tag dokumentiert. Für die Dokumentation wurde ausschließlich die vegetative Wachstumsphase der Pflanzen berücksichtigt. Um den sichtbaren Entwicklungsstufen des Wachstums von *Arabidopsis thaliana* auf Erde gerecht zu werden, wurde der BBCH-Index leicht modifiziert. Die dokumentierten Entwicklungsstufen sowie deren Zuordnungskriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** BBCH-Index zur Dokumentation der Pflanzenentwicklung; modifiziert nach Hess et al. (1997).

Entwicklungsstufe	Beschreibung des Phänotyps
7	Hypokotyl hat Samenschale durchbrochen
9	Kotyledonen an Bodenoberfläche entfaltet
10	Kotyledonen voll entfaltet; Ansatz beider erster Laubblätter sichtbar
12	Beide erste Laubblätter voll entfaltet; drittes Laubblatt sichtbar
13	Drittes Laubblatt voll entfaltet, viertes Laubblatt sichtbar
	usw.
19	Neuntes Laubblatt voll entfaltet; <b>Ende der Dokumentation</b>

Im Alter von 5 Wochen wurden die Pflanzen wie unter 2.3.4 beschrieben geerntet.

### 2.2.2 Bestimmung des Frischgewichts

Das Samenmaterial wurde wie unter 2.1.2 beschrieben auf Erde ausgebracht und das Frischgewicht der Pflanzen nach 3, 4 und 5 Wochen Wachstum bestimmt. Dazu wurden

die Rosetten von 5 - 6 Pflanzen pro Genotyp am Hypokotyl abgeschnitten und ihr Gewicht mit Hilfe einer Feinwaage (Kern & Sohn, Balingen, Deutschland) bestimmt.

### **2.3 Behandlung und Ernten der Pflanzen**

#### 2.3.1 Begasung und Ernte von Erdkulturen

Das Pflanzenmaterial wurde im Alter von 5 Wochen in Acrylglas-Boxen im Dunkeln begast, indem Luft mit 21 % Sauerstoff (Normoxie) oder mit 1 % Sauerstoff (Hypoxie; weitere Zusammensetzung: Stickstoff und 350 ppm CO<sub>2</sub>) in die Boxen strömte. Die Pflanzen wurden hierfür am Ende der Lichtperiode von der Klimakammer in die Begasungsboxen überführt und während ihres normalen Nachtrhythmus für 16 h begast. Direkt im Anschluss wurden die Rosetten am Hypokotyl abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde mithilfe einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) im gefrorenen Zustand zu Pulver gemahlen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.3.2 Begasung und Ernte steriler Plattenkulturen

Im Alter von einer Woche wurden die Pflanzen 2 h nach Beginn der Lichtperiode aus der Sterilkammer geholt und entweder begast oder direkt geerntet. Pflanzen zur Überprüfung der post-anoxischen Überlebensrate wurden auf den Agarplatten in Acrylglas-Boxen im Dunkeln begast, indem reiner Stickstoff (0 % Sauerstoff, Anoxie) in die Boxen strömte. Dabei wurden die Pflanzen ohne Zuckerzusatz für 6,5 h bzw. die Pflanzen mit Saccharose im Medium für 8 h behandelt. Im Anschluss wurden die Platten zurück in die Sterilkammer gebracht und nach einer Woche die Überlebensraten der Pflanzen bestimmt. Dabei wurden Pflanzen, an welchen mindestens zwei neue grüne Laubblätter entstanden waren, als überlebend gewertet. Der Mittelwert jeder Platte stellte ein biologisches Replikat dar. Das Pflanzenmaterial auf 2 % Agarplatten wurde mit Beginn der Begasung geerntet, indem die Platten mit der Oberseite nach unten in flüssigen Stickstoff getaucht wurden, sodass die Rosetten der Pflanzen unmittelbar einfroren. Diese wurden dann mit einem Spatel in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt, wie in 2.3.1 beschrieben zu Pulver gemahlen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.3.3 Mitochondrien-Isolation

Die Mitochondrien wurden mittels PVP-Percoll-Gradienten nach Day et al. (1985) isoliert. Dabei erfolgte die gesamte Extraktion bei 4 °C. Zunächst wurden die Pflanzen aus der Halbflüssigkultur in einen mit Mirachloth (Merck Millipore, Burlington, USA)

ausgekleideten Büchnertrichter überführt und mehrfach mit eiskaltem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. Das Pflanzenmaterial wurde dann zügig in einem Mörser in der 20 x Menge Extraktionspuffer (300 mM Saccharose, 1,5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 15 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure, 0,4 % lipidfreies Rinderserumalbumin (BSA), 0,6 % Polyvinylpyrrolidon K 30, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 100 mM Ascorbinsäure; pH 7,4/KOH) zerkleinert. Der durch Miracloth gefilterte Extrakt wurde anschließend für 5 min bei 2500 rpm abzentrifugiert (Beckman Coulter, Brea, USA), der Überstand in frische Zentrifugenbecher überführt und für 20 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit einem weichen Pinsel vorsichtig in einer geringen Menge des Überstands resuspendiert und in 100 ml Waschpuffer (300 mM Saccharose, 10 mM N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES) pH 7,5/KOH, 0,1 % lipidfreies BSA) aufgenommen. Anschließend wurden die Zentrifugationsschritte wiederholt, das Pellet erneut in einer kleinen Menge des Überstands resuspendiert und auf einem 0 - 4,4 % PVP-Percoll-Gradienten (0 % bis 4,4 % Polyvinylpyrrolidon-40, 300 mM Saccharose, 10 mM TES pH 7,5/KOH, 0,1 % lipidfreies BSA, 28 % Percoll) für 40 min bei 18000 rpm aufgetrennt. Die Mitochondrien wurden vorsichtig entnommen und zweimal in Finalwaschpuffer (300 mM Saccharose, 10 mM TES pH 7,5/KOH) mittels Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in etwa 500  $\mu\text{l}$  Finalwaschpuffer resuspendiert, die Proben mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.4 Ernte zu verschiedenen Tageszeitpunkten

Pflanzen von Erdkulturen, die bei Kurztagbedingungen entweder in der Klimakammer oder im Klimaschrank gewachsen waren (siehe 2.1.2), wurden im Alter von 5 Wochen je am Ende der Nacht (bei Grünlicht) und am Ende des Tages geerntet. Dazu wurden die Rosetten am Hypokotyl abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde wie in 2.3.1 beschrieben zu Pulver gemahlen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Für Pflanzen, die bei konstantem Licht gewachsen waren (siehe 2.1.2), erfolgte die Ernte nach demselben Verfahren an einem beliebigen Tageszeitpunkt.

### 2.3.5 Nach Blattalter separierte Ernte

Nach 5 Wochen Wachstum wurden die Blätter von Pflanzen auf Erdkultur separiert nach ihrem Blattalter geerntet. Dazu wurden die Rosetten am Hypokotyl abgeschnitten und die beiden Kotyledonen entfernt. Anschließend wurden die Blätter entsprechend ihrer Blattnummern in flüssigem Stickstoff eingefroren, wobei die Nummern 3 - 6 als alte Blätter, Nummern 7 - 11 als mittlere Blätter und alle darauffolgenden Nummern als junge

Blätter vereinigt wurden. Außerdem wurde das Material des entsprechenden Alters von je 3 Pflanzen zu einem biologischen Replikat zusammengefasst. Die Ernte erfolgte in der Mitte der Lichtperiode. Das Pflanzenmaterial wurde wie in 2.3.1 beschrieben zu Pulver gemahlen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.4 Messung der Atmungsrate**

Nach 5 Wochen Wachstum auf Erde wurden am Ende der Nacht mithilfe von Korkbohrern Blattscheiben aus den Pflanzen ausgestochen, sodass alle Blattalter repräsentativ vertreten waren. Die Blattscheiben wurden gewogen und in luftdicht verschließbare, mit Puffer (50 mM MES pH 6,5/KOH) gefüllte Glasgefäße überführt, in welchen mittels OXY-4 mini Sauerstoffsensoren (PreSens, Regensburg, Deutschland) der Sauerstoffverbrauch im Dunkeln bestimmt wurde.

### **2.5 Gaswechsel-Messung**

Am Tag vor der Gaswechsel-Messung wurden die entsprechenden Pflanzen im Alter von 5 Wochen aus großen Pflanzschalen in kleine Pflanztöpfe umgesetzt und mit je 20 ml Wasser angegossen. Die Pflanzen wurden mindestens 20 min dunkeladaptiert, bevor die Messung im GFS-3000 Gaswechsel-System (bestehend aus Kontrolleinheit 3000-C, Messkopf 3010-S und Arabidopsis-Kammer 3010-A; Walz, Effeltrich, Deutschland) bei 20 °C, 60 % relativer Luftfeuchtigkeit, 400 ppm CO<sub>2</sub>, einer Impellergeschwindigkeit von 7 und einer Flussrate von 750 μmol s<sup>-1</sup> erfolgte. Die Lichtintensität wurde schrittweise von 0 μmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> über 50, 100, 150, 200, 300, 400, 600 und 800 auf 1000 μmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> erhöht, wobei bei jedem Schritt die Messung erst nach Stabilisierung der Parameter ΔCO<sub>2</sub> und ΔH<sub>2</sub>O erfolgte. Im Anschluss wurden die Rosetten am Hypokotyl abgeschnitten und ihr Frischgewicht bestimmt. Die Berechnung der CO<sub>2</sub> Assimilationsrate und der interzellulären CO<sub>2</sub> Konzentration erfolgte mithilfe der zugehörigen Software GFS-Win V3.50b.

### **2.6 Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz mittels Pulsamplitudenmodulation**

Für die Messung der photosynthetischen Parameter von Photosystem II (PSII) wurden Pflanzen im Alter von 5 Wochen zunächst mindestens 20 min dunkeladaptiert, bevor die Pulsamplitudenmodulation (PAM)-Messung im IMAGING-PAM Fluoreszenzspektrometer (Walz, Effeltrich, Deutschland) erfolgte. Zunächst wurde ein lichtsättigender Puls gegeben, durch den die maximale Quanteneffizienz von PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) bestimmt wurde. Im

Anschluss wurden alle 20 s die effektive Quantenausbeute von PSII ( $\Phi$  PSII) sowie die Quantenausbeuten der regulierten bzw. der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi$  NPQ bzw.  $\Phi$  NO) aufgezeichnet. Dafür wurde die Lichtintensität so nah wie möglich am Wachstumslicht gewählt und betrug  $145 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Die entsprechenden Einstellungen waren: Delay 40 s, Clock 20 s, Duration 540 s, Measuring light 1, Frequency 4, Saturation pulse 20 s, Gain 2, Damping 2. Die Apertur war vollständig geöffnet. Die Berechnung von  $F_v/F_m$ ,  $\Phi$  PSII,  $\Phi$  NPQ und  $\Phi$  NO erfolgte mithilfe der zugehörigen Software ImagingWin v2.46i.

## 2.7 Quantifizierung von Transkripten

### 2.7.1 Isolation der mRNA

Die Isolation der mRNA erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen (Venlo, Niederlande). Dafür wurden jeweils 50 mg des gefrorenen, gemahlten Pflanzenmaterials eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration sowie die Qualität der RNA wurden anschließend am NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt.

### 2.7.2 Synthese der cDNA

Die Synthese von cDNA aus der isolierten RNA erfolgte mithilfe des iScript cDNA Synthesis Kits von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA). Dafür wurden jeweils 500 ng RNA eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss wurden die Proben mit autolaviertem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf ein Endvolumen von 30  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und die Qualität der cDNA mithilfe einer PCR gegen das Actin-Transkript mit den Primern Actin FW (5'-TGCGACAATGGAAGTGGAAATG-3') und Actin RV (5'-GGATAGCATGTGGAAGTGCATACC-3') überprüft.

### 2.7.3 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time PCR (qRT PCR) erfolgte mithilfe des iQ SYBR Green Supermix Kits von Bio-Rad (Hercules, USA). Dazu wurde die cDNA erst 1:10 verdünnt, bevor mit einem Volumen von je 2  $\mu\text{l}$  nach Herstellerangaben gearbeitet wurde. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgeführt, wobei *RUB1 CONJUGATING ENZYME 1 (RCE1)* das Referenzgen darstellt.

MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 2:** Auflistung zur qRT PCR verwendeter Primer.

<b>Primername</b>	<b>AGI Code</b>	<b>Primersequenz (5' - 3')</b>
RCE1 FW	AT4G36800	CTGTTACGGAACCCAATTC
RCE1 RV		GGAAAAAGGTCTGACCGACA
RAP2.12 qRT FW	AT1G53910	TGCGGAAGGTTCAGTTTTTGG
RAP2.12 qRT RV		CAGCCCATTTCCCAAGGA
ADH1 qRT FW	AT1G77120	TATTCGATGCAAAGCTGCTGTG
ADH1 qRT RV		CGAACTTCGTGTTTCTGCGGT
PDC1 qRT FW	AT4G33070	CGATTATGGCACTAACCAGGATT
PDC1 qRT RV		TGTTACCACCGCCTGATAAC
HB1 qRT FW	AT2G16060	TTTGAGGTGGCCAAGTATGCA
HB1 qRT RV		TGATCATAAGCCTGACCCCAA
SUS4 qRT FW	AT3G43190	CGCAGAACGTGTAATAACGCG
SUS4 qRT RV		CAACCCTTGAGAGCAAAGCAAA
ALAAT1/2 qRT FW	AT1G17290 / AT1G72330	GTCAAATCCTTGCTAGCC
ALAAT1 qRT RV	AT1G17290	CCCTCTAGCTTGTTGAGA
ALAAT2 qRT RV	AT1G72330	TAAACTGTTGAGAGCGTC
AOX1A qRT FW	AT3G22370	GACGGTCCGTACGGTTTTCG
AOX1A qRT RV		CTTCTGATTGCGCTCCTCTC
SDH1-2 qRT FW	AT2G18450	CAAACGGGTCACTTCCAAC
SDH1-2 qRT RV		CCAAAAGTGTCCACGTCTT
WEE1 qRT FW	AT1G02970	TGGTGCTGGACATTTCAAGTCGG
WEE1 qRT RV		CAAGAGCTTGCACTTCCATCATAG
CYCB1;1 qRT FW	AT4G37490	CTCAAAATCCCACGCTTCTTGTTGG
CYCB1;1 qRT RV		CACGTCTACTACCTTTGGTTTCCC
RBR qRT FW	AT3G12280	ATAATAAGCCTGAAGGTCAATGTC
RBR qRT RV		TAAACATTGTGCACTGCAGATACT
KUODA1 qRT FW	AT5G47390	TCGCTGGTGATGGTTACGCTTC
KUODA1 qRT RV		TCCTCTGTCCATGGAGTTCTTTTC
PER7 qRT FW	AT1G30870	GGCGTCACGGGATGTGAT
PER7 qRT RV		GTTAGGATGTCGGCGCAGGATA
HR4 qRT FW	AT3G50480	CCATTTAGGGAAGTCCACGA
HR4 qRT RV		CACGTGCTACCCTTACTAATTC
GSTU24 qRT FW	AT1G17170	GAGACTTGGCCCCGACAATAA
GSTU24 qRT RV		CTCGCCGTAACATTACCTT

Die qRT PCR erfolgte dann mit je 3 technischen Replikaten pro Probe im IQ5 iCycler von Bio-Rad (Hercules, USA), wobei im Anschluss an das PCR-Programm stets eine Schmelzkurve zur Qualitätsprüfung durchgeführt wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Pfaffl (2001). Dazu wurde die relative Transkriptmenge zunächst mithilfe des Referenzgens *RCE1* ermittelt und im Anschluss auf die Transkriptmenge des WT bei Kontrollbedingungen normalisiert (genaue Angaben in den jeweiligen Abbildungsbeschriftungen).

## 2.8 Messung von Enzymaktivitäten

### 2.8.1 Alkohol Dehydrogenase

20 mg gefrorenes, gemahlendes Pflanzenmaterial wurden in 200 µl Extraktionspuffer (50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) pH 7,4/KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA), 0,1 % Triton X-100, 10 % Glycerin, 2 mM Benzamidin, 2 mM ε-Aminocaprinsäure, 5 mM DTT, 0,5 % Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgenommen, für 10 min bei 4 °C auf einem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) geschüttelt und für 10 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend erfolgte die Messung der ADH Enzymaktivität nach John und Greenway (1976). Dafür wurden in einer Mikrotiterplatte pro Probe 4 technische Replikate angefertigt, wofür je 30 µl des Überstands mit 170 µl Detektionspuffer bestehend aus 50 mM Bicin (pH 8,8/KOH), 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mM NAD<sup>+</sup> gemischt wurden. Zu je 2 technischen Replikaten wurde zusätzlich 1 µl 100 % Ethanol gegeben und sofort die NADH-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz über die dabei gemessene Steigung nach Subtraktion der Steigung ohne Substrat.

### 2.8.2 Pyruvat Decarboxylase

20 mg gefrorenes, gemahlendes Pflanzenmaterial wurden in 500 µl des in 2.6.1 beschriebenen Extraktionspuffers aufgenommen und wie in 2.6.1 extrahiert. Die Messung der Pyruvat Decarboxylase (PDC)-Enzymaktivität erfolgte dann nach Bouny und Saglio (1996). Dafür wurden in einer Mikrotiterplatte pro Probe 4 technische Replikate angefertigt, wofür je 30 µl des Überstands mit 170 µl Detektionspuffer bestehend aus 100 mM Tricin (pH 6,5/KOH), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Oxamat, 0,1 mM DTT, 0,1 mM Thiaminpyrophosphat, 0,15 mM NADH und 300 U ml<sup>-1</sup> ADH gemischt wurden. Zu je 2 technischen Replikaten wurde zusätzlich 2 mM Pyruvat gegeben und sofort die NAD-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz über die dabei gemessene Steigung nach Subtraktion der Steigung ohne Substrat.

### 2.8.3 Laktat Dehydrogenase

20 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial wurden in 300 µl Extraktionspuffer (50 mM HEPES pH 7,4/KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 % Triton X-100, 10 % Glycerin, 1 % Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) und 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgenommen und wie in 2.6.1 extrahiert. Die Messung der Laktat Dehydrogenase (LDH)-Enzymaktivität erfolgte dann nach Bouny und Saglio (1996). Dafür wurden in einer Mikrotiterplatte pro Probe 4 technische Replikate angefertigt, wofür je 30 µl des Überstands mit 170 µl Detektionspuffer bestehend aus 100 mM Tricin (pH 7,5/KOH), 100 mM Pyrazol, 10 mM Kaliumcyanid und 0,15 mM NADH gemischt wurden. Zu je 2 technischen Replikaten wurde zusätzlich 2 mM Pyruvat gegeben und sofort die NAD-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz über die dabei gemessene Steigung nach Subtraktion der Steigung ohne Substrat.

### 2.8.4 Alanin Aminotransferase

10 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial wurden in 1 ml des in 2.6.1 beschriebenen Extraktionspuffers aufgenommen und wie in 2.6.1 extrahiert. Die Messung der AlaAT Enzymaktivität erfolgte dann nach Hatch und Mau (1973). Dafür wurden in einer Mikrotiterplatte pro Probe 4 technische Replikate angefertigt, wofür je 30 µl des Überstands mit 170 µl Detektionspuffer bestehend aus 50 mM HEPES (pH 7,5/KOH), 2 mM EDTA, 10 mM L-Alanin, 0,04 mM Pyridoxal-5-Phosphat, 0,2 mM NADH und 5,9 U ml<sup>-1</sup> LDH gemischt wurden. Zu je 2 technischen Replikaten wurde zusätzlich 0,5 mM α-Ketoglutarat gegeben und sofort die NAD-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz über die dabei gemessene Steigung nach Subtraktion der Steigung ohne Substrat.

### 2.8.5 Succinat Dehydrogenase

Isolierte Mitochondrien (siehe 2.3.3) wurden auf Eis aufgetaut und ihre Proteinkonzentration mithilfe eines Bradford-Tests (Roti-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach Herstellerangaben ermittelt. Die Messung der SDH Enzymaktivität erfolgte dann nach Miyadera et al. (2003). Es wurden 5 µg mitochondriales Protein mit 1,5 mM 2-Thenoyltrifluoroacetone für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in einer Mikrotiterplatte mit 150 µl Detektionspuffer bestehend aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8), 0,6 mM 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, 2 mM Flavinadenin dinukleotid und 0,75 mM Phenazinmethosulfat gemischt. Zu je 2 der

4 technischen Replikate wurde zusätzlich 10 mM Succinat gegeben und sofort die Absorption minütlich bei 570 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz über die dabei gemessene Steigung nach Subtraktion der Steigung ohne Substrat.

### 2.9 Quantifizierung von Metaboliten

#### 2.9.1 Quantifizierung von Ethanol

Die Pflanzen in Flüssigkultur in Mikrotiterplatten wurden 10 h nach Beginn der Lichtperiode aus der Sterilkammer geholt, das Wachstumsmedium pro Napf gegen 250 µl frisches Medium (90 mM Saccharose in 1/2 MS-Medium pH 5,7/KOH) getauscht und dann für 16 h in Acrylglas-Boxen im Dunkeln bei normoxischen oder anoxischen Bedingungen begast. Anschließend wurden sofort 20 µl des Mediums pro Napf entnommen, in einer Mikrotiterplatte mit 180 µl Reaktionspuffer (72 mM Natriumpyrophosphat pH 8,7, 72 mM Semicarbazid, 25 mM Glycin und 0,5 mM NAD<sup>+</sup>) gemischt und nach Zugabe von 39 U ml<sup>-1</sup> ADH die NADH-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) bestimmt. Die Berechnung der Ethanolkonzentration erfolgte über die gleichzeitige Messung einer Ethanol-Standardreihe.

#### 2.9.2 Metabolitquantifizierung mittels GC-TOF-MS

Die Quantifizierung polarer Metabolite mittels GC-TOF-MS erfolgte wie in Thormählen et al. (2013) beschrieben und wurde von der Serviceeinheit für Massenspektrometrie – Metabolomics (Dr. Martin Lehmann, Department Biologie I der LMU München) durchgeführt. Die Methode zur Extraktion erfolgte dabei in Anlehnung an Erban et al. (2007), Lisec et al. (2006) und Roessner et al. (2001). Dafür wurden 50 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial in 100 µl eiskaltem Methanol, das als interne Standards 5 µl Ribitol (0,2 mg ml<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) und 2 µl <sup>13</sup>C-Sorbitol (0,2 mg ml<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) enthielt, aufgenommen, gut durchmischt und für 15 min bei 70 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50 µl Chloroform zugegeben und für 10 min bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden die Extrakte mit 100 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Für zwei technische Replikate wurden je 30 µl der oberen (polaren) Phase abgenommen und unter Vakuum getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg ml<sup>-1</sup> in Pyridin) aufgenommen und für 90 min bei 40 °C derivatisiert. Anschließend wurden 20 µl N,O-

Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, das 2,5  $\mu\text{l}$  Retentionszeit-Standardmix bestehend aus n-Decan, n-Dodecan, n-Pentadecan, n-Nonadecan, n-Docosan, n-Octacosan und n-Dotriacontan enthielt, zugefügt und für 45 min bei 40 °C inkubiert. Pro Probe wurde 1  $\mu\text{l}$  des Extrakts von einem Autosampler (Combi PAL, CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) in das GC-TOF-MS System (Pegasus HT, Leco, St. Joseph, USA) injiziert, wobei Helium mit einer konstanten Flussrate von 1  $\text{ml min}^{-1}$  als Trägergas diente. Die Gaschromatografie erfolgte mithilfe einer 30 m VF-5ms Säule gekoppelt mit einer 10 m EZ-Vorsäule in einem Agilent 7890A Gaschromatographen (Santa Clara, USA). Die Injektionstemperatur des CIS4 Injektors (Gerstel, Mühlheim, Deutschland) stieg um 12 °C  $\text{min}^{-1}$  von 68 °C auf 275 °C. Die Temperatur der Transfer-Line und der Ionenquelle waren auf 250 °C eingestellt und die Ofentemperatur stieg um 9 °C  $\text{min}^{-1}$  von 70 °C auf 320 °C. Die Einstellung der Lösungsmittelverzögerung betrug 340 s. Zur Time-of-flight Massenspektrometrie wurden die aufgetrennten Metabolite durch einen Ionenpuls von 70 eV ionisiert und fraktioniert. Die Aufzeichnung der Massenspektren am Detektor erfolgte mit 20 Scans  $\text{s}^{-1}$  und einem Masse/Ladungs-Scanbereich von 35 - 800. Die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mithilfe der Programme ChromaTOF (Leco, St. Joseph, USA) und TagFinder (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam, Deutschland) nach Luedemann et al. (2008).

### 2.9.3 Quantifizierung von Stärke und löslichen Zuckern

Die Quantifizierung von Stärke und löslichen Zuckern erfolgte nach Hendriks et al. (2003). Dafür wurden 20 mg gefrorenes, gemahltes Pflanzenmaterial in 250  $\mu\text{l}$  80 % Ethanol aufgenommen, für 30 min auf 90 °C erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur für 5 min bei 14000 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf Eis verwahrt. Die Extraktionsschritte wurden noch zweimal wiederholt, wobei die Ethanolkonzentration im letzten Schritt 50 % betrug. Die Überstände wurden dabei vereinigt und bis zur Determination der löslichen Zucker bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde für 40 min bei 30 °C unter Vakuum getrocknet (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), in 400  $\mu\text{l}$  100 mM NaOH aufgenommen und für 1 h bei 95 °C und 1400 rpm geschüttelt (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Lösung wurde mit 500 mM HCl und 100 mM Essigsäure (pH 4,9/NaOH) neutralisiert und 40  $\mu\text{l}$  davon mit 110  $\mu\text{l}$  Stärkedegradationsmix (50 mM Essigsäure pH 4,9/NaOH, 3 U  $\text{ml}^{-1}$  Amyloglucosidase und 4 U  $\text{ml}^{-1}$   $\alpha$ -Amylase) über Nacht bei 37 °C verdaut. Für die Stärkequantifizierung wurden 50  $\mu\text{l}$  des verdauten Extrakts in einer Mikrotiterplatte mit 160  $\mu\text{l}$  Glukosedeterminationsmix (100 mM HEPES pH 7/KOH, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM ATP, 1,4 mM  $\text{NADP}^+$  und 3,4 U  $\text{ml}^{-1}$  Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) gemischt und vor sowie nach Zugabe von je 2,4 U  $\text{ml}^{-1}$  Hexokinase die

NADPH-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Zur Quantifizierung der löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose wurden 50 µl der Überstände in einer Mikrotiterplatte mit Determinationsmix (50 mM HEPES pH 7/KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,76 mM NADP, 1,81 mM ATP und 0,8 U ml<sup>-1</sup> Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) gemischt und die NADPH-Produktion minütlich bei 340 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) gemessen. Dabei wurde zunächst Glukose durch Zugabe von 2,5 U ml<sup>-1</sup> Hexokinase, dann Fruktose durch Zugabe von 1,5 U ml<sup>-1</sup> Phosphoglukose Isomerase und abschließend Saccharose durch Zugabe von 600 U ml<sup>-1</sup> Invertase detektiert. Die Berechnung der jeweiligen Metabolitkonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz über die Differenz der gemessenen NADPH-Konzentrationen vor und nach Enzymzugabe.

#### 2.9.4 Quantifizierung von Pyridinnukleotiden

Die Extraktion der Pyridinnukleotide erfolgte nach Hajirezaei et al. (2002), die Quantifizierung nach Gibon et al. (2004). Dafür wurden 25 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial zur Extraktion der oxidierten Form der Pyridinnukleotide in 250 µl 100 mM Perchlorsäure bzw. zur Extraktion der reduzierten Form in 250 µl 100 mM Kaliumhydroxid aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen und für 2 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe der gleichen Menge 200 mM Tris (pH 8,4) mit 100 mM Kaliumhydroxid bzw. 200 mM Tris (pH 8,4) mit 100 mM Perchlorsäure neutralisiert. 25 µl (für NAD<sup>+</sup>) bzw. 50 µl (für NADH) des Extrakts wurden auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt, zur Detektion von NAD(H) mit 50 µl Reaktionsmix bestehend aus 300 mM Tricin (pH 9/KOH), 12 mM EDTA, 0,3 mM Phenazinethosulfat, 1,8 mM 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, 1,5 M Ethanol und 18 U ml<sup>-1</sup> ADH gemischt und die Absorption bei 570 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) minütlich aufgezeichnet. Zur Detektion von NADP(H) bestand der Reaktionsmix aus 300 mM Tricin (pH 9/KOH), 12 mM EDTA, 0,3 mM Phenazinethosulfat, 1,8 mM 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, 9 mM Glukose-6-Phosphat und 9 U ml<sup>-1</sup> Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase. 20 µl (für NADP<sup>+</sup>) bzw. 30 µl (für NADPH) Extrakt wurden dafür auf 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt, mit 50 µl Reaktionsmix gemischt und die Absorption bei 570 nm bestimmt. Die Berechnung der Pyridinnukleotidkonzentration erfolgte über ebenfalls gemessene Standardreihen.

### 2.9.5 Quantifizierung von ATP und ADP

Die Extraktion von ATP und Adenosindiphosphat (ADP) erfolgte nach Trethewey et al. (1998). Dafür wurden 50 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial in 600 µl 16 % Trichloressigsäure in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  mit 5 mM EGTA aufgenommen und für 1 h bei 4 °C auf einem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) geschüttelt. Nach Zentrifugation (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm wurde der Überstand mit 4 ml kaltem wassergesättigtem Diethylether gemischt und erneut zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die obere Phase wurde verworfen, die Waschschritte nochmals wiederholt und der pH-Wert der Proben mit 5 M Kaliumhydroxid und 1 M Triethanolamin auf 6 - 7 eingestellt. Nach Abdampfen des restlichen Diethylethers für 1 h auf Eis erfolgte die Quantifizierung von ATP und ADP in den Extrakten. Zur ATP Quantifizierung wurden 85 µl des Extrakts mit 200 µl Reaktionsmix (50 mM HEPES pH 7/KOH, 0,4 mM  $\text{NADP}^+$ , 13 mM Glukose, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 7,5 U  $\text{ml}^{-1}$  Phosphoglukose Isomerase und 0,1 U  $\text{ml}^{-1}$  Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase) gemischt und nach Zugabe von 1,5 U  $\text{ml}^{-1}$  Hexokinase die NADPH-Produktion durch Fluoreszenzspektroskopie bei 360 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) aufgezeichnet. Für die Quantifizierung von ADP wurden 75 µl Extrakt mit 200 µl Reaktionsmix (50 mM HEPES pH 7/KOH, 0,02 mM NADH, 0,9 mM Phosphoenolpyruvat, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 15 U  $\text{ml}^{-1}$  LDH) gemischt und nach Zugabe von 10 U  $\text{ml}^{-1}$  Pyruvatkinase die NAD-Produktion ebenfalls durch Fluoreszenzspektroskopie bei 360 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) minütlich bestimmt. Die Berechnung der ATP- und ADP-Konzentration erfolgte über ebenfalls gemessene Standardreihen.

### 2.9.6 Quantifizierung von Glutathion

Die Quantifizierung von Glutathion erfolgte nach Queval und Noctor (2007). Dazu wurden 25 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial in 250 µl 200 mM HCl aufgenommen, für 4 min auf einem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) geschüttelt und dann für 10 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 200 µl des Überstands wurden mit 20 µl 200 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 5,6) versetzt und anschließend mit 200 mM NaOH auf einen pH-Wert von 5 - 6 eingestellt. 10 µl des Extrakts wurden mit 190 µl Reaktionspuffer (100 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 mM NADPH und 0,6 mM Ellmans Reagenz) gemischt und nach Zugabe von 1 U  $\text{ml}^{-1}$  Glutathion Reduktase die Absorption bei 412 nm im Photometer (FilterMax F5, Molecular Devices, San José, USA) minütlich gemessen. Die Messung erfolgte sowohl für den unbehandelten Gesamtextrakt, der die reduzierte (GSH) und die oxidierte (GSSG) Form

von Glutathion enthielt, als auch für den Anteil an GSSG alleine. Für diesen wurden die Gesamtextrakte zuvor für 30 min mit einem Tropfen 2-Vinylpyridin inkubiert. Die Berechnung der Glutathionkonzentration erfolgte durch die gleichzeitige Messung von Standardreihen. Der Anteil an GSH im Gesamtextrakt wurde durch Subtraktion der Werte für GSSG unter Berücksichtigung, dass bei der Reduktion von einem Molekül GSSG zwei Moleküle GSH entstehen, errechnet.

### **2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Zur Proteinextraktion aus Blattmaterial wurden 30 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial in 300 µl 2x Laemmli Puffer (4 % SDS, 10 % Glycerin, 125 mM Tris pH 6,8/HCl und 0,1 % Bromphenolblau) mit 5 % β-Mercaptoethanol aufgenommen und auf einem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) gemischt. Für die Proteinextraktion aus Mitochondrien wurden diese auf Eis aufgetaut und ebenfalls in 2x Laemmli Puffer mit 5 % β-Mercaptoethanol aufgenommen, wobei die Endkonzentration 0,5 µg/µl mitochondriales Protein betrug. Alle Extrakte wurden dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, für 5 min auf 90 °C erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 10 µl der Pflanzenextrakte bzw. 5 µl der Mitochondrienextrakte wurden auf nichtreduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen (Trenngel: 10/12/15 % Acrylamid/Bisacrylamid 30 %, 375 mM Tris pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,04 % TEMED; Sammelgel: 5 % Acrylamid/Bisacrylamid 30 %, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED; SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8, 1,44 % Glycin, 0,1 % SDS) aufgetrennt und entweder für eine Coomassie-Gelfärbung oder für Western Blots verwendet.

Die Coomassie-Gelfärbung erfolgte nach kurzem Waschen der entsprechenden Gele in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> über Nacht entweder in einer Färbelösung bestehend aus 0,02 % Coomassie-Brillant-Blau G-250, 5 % Aluminiumsulfat, 10 % Ethanol und 2 % Phosphorsäure oder aus 0,3 % Coomassie-Brillant-Blau R-250, 10 % Essigsäure und 45 % Methanol. Die Entfärbung erfolgte dann für Ersteres mittels 10 % Ethanol und 2 % Phosphorsäure und für Letzteres mit 7 % Essigsäure, 50 % Methanol und 5 % Glycerin, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Für die Western Blots wurde pro Gel eine PVDF-Membran (Immobilon-P 0,45 µm, Merck Millipore, Burlington, USA) für 20 s in 100 % Methanol aktiviert und zusammen mit dem entsprechenden Gel für 20 min in Wet blotting-Puffer (1,1 % Glycin, 0,25 % Tris, 10 % Methanol) equilibriert. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte für 75 min bei 100 V. Die Membranen wurden dann für 1 h bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer bestehend aus 5 % Milchpulver in Tris-gepufferter

Kochsalzlösung (TBS: 10 mM Tris pH 7,5/HCl, 150 mM NaCl) mit 0,1 % Tween 20 geschwenkt und über Nacht mit dem primären Antikörper (in Blocking-Puffer; siehe Tabelle 3) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal für 5 min in TBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Agrisera AS09 602 horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG; 1:10000 in Blocking-Puffer) inkubiert. Die Membranen wurden erneut zweimal in TBS mit und einmal ohne 0,1 % Tween 20 gewaschen und die Antikörper-gebundenen Proteine mittels ECL-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf Röntgenfilmen (Super RX, Fujifilm, Minato, Japan) detektiert. Die Ermittlung der Bandenintensität erfolgte mithilfe der Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Alle primären Antikörper wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dario Leister (LMU München) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3:** Auflistung zur Immunodetektion verwendeter primärer Antikörper, die ausnahmslos in Kaninchen produziert wurden.

<b>Antikörpername</b>	<b>Agrisera Code</b>	<b>Verdünnung in Blocking-Puffer</b>	<b>Acrylamid-Konzentration des Trenngels</b>
anti-PsaD	AS09 461	1:1000	15 %
anti-PsbA	AS05 084	1:10000	15 %
anti-PsbD	AS06 146	1:5000	15 %
anti-Lhca1	AS01 005	1:10000	15 %
anti-Lhcb1	AS01 004	1:5000	15 %
anti-Atpβ	AS05 085	1:5000	10 %
anti-RbcL	AS03 037	1:5000	10 %
anti-AOX1/2	AS04 054	1:500	12 %

### 2.11 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Extraktion des Chlorophylls erfolgte auf Eis im Dunkeln. 25 mg gefrorenes, gemahlene Pflanzenmaterial wurden in 1 ml eiskaltem 80 % Aceton aufgenommen, für 2 min auf einem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 13200 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde der Überstand abgenommen und auf Eis verwahrt. Das Pellet wurde erneut wie beschrieben in 1 ml 80 % Aceton extrahiert, jedoch wurde mit 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, 1:10 in 80 % Aceton verdünnt und das enthaltene Chlorophyll in einer Quarz-Küvette am Photometer (Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, Amersham, Vereinigtes Königreich) bei 750 nm, 664 nm und 647 nm bestimmt.

## 2.12 Statistische Auswertung

Die Darstellung und statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2010 (Redmond, USA) und SigmaPlot 11.0 bzw. 14.0 (Systat, San José, USA).

## 2.13 Verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Duchefa (Haarlem, Niederlande), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland). Adenosinphosphate und Pyridinnukleotide, die für photometrische Messungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 4 separat aufgeführt.

**Tabelle 4:** Auflistung für photometrische Messungen verwendeter Adenosinphosphate und Pyridinnukleotide.

<b>Substanz</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
ATP	≥ 99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
ADP	≥ 96 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
FAD	≥ 95 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
NAD	≥ 97 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
NADH	≥ 98 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NADP	≥ 97 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NADPH	≥ 97 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammen von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Roche (Basel, Schweiz).

### 3 Ergebnisse

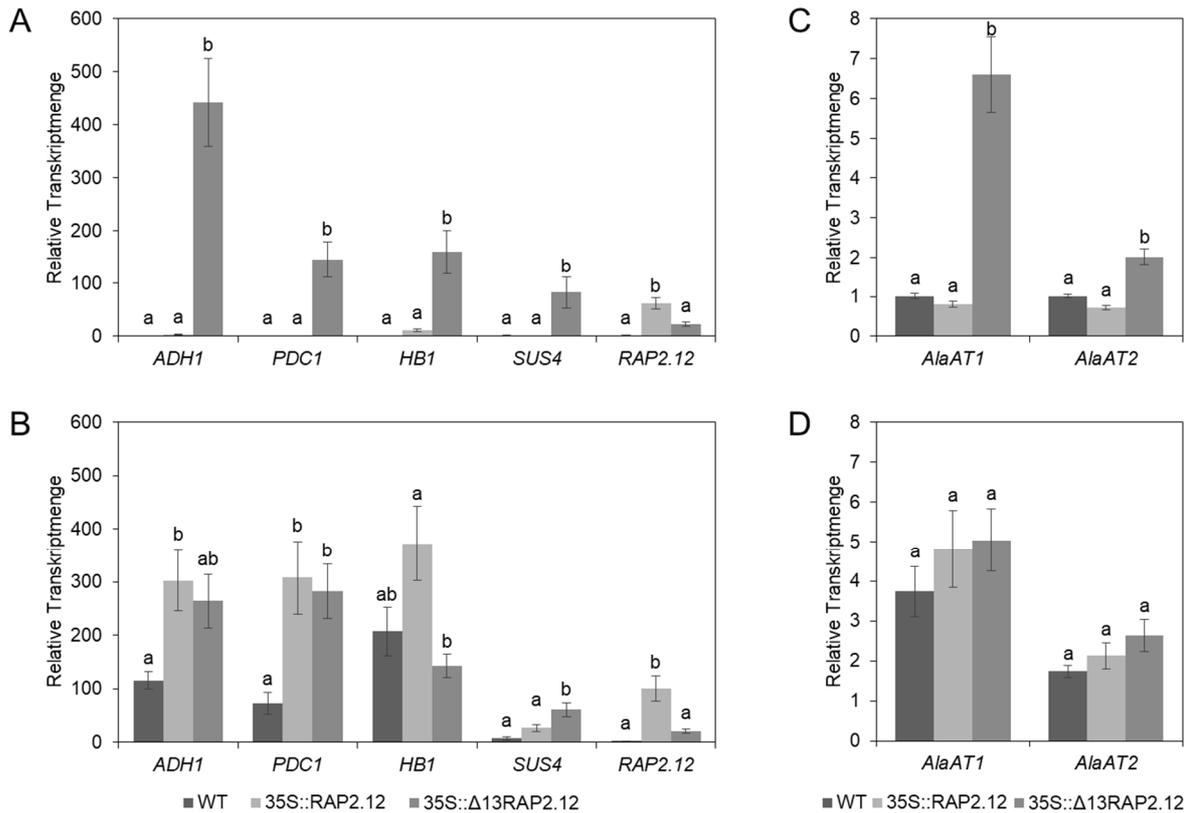
#### 3.1 Die Bedeutung von RAP2.12 für die Gärung bei normalem und verringertem Sauerstoffgehalt

Die Charakterisierung der Linien 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 durch Licausi et al. (2011b) zeigte, dass die Überexpression des vollständigen *RAP2.12* Gens in *Arabidopsis* zu einer erhöhten Expression hypoxischer Markergene bei Überflutung führt, die Überexpressoren der deletierten Form diese Gene jedoch auch unter Normoxie stark exprimieren. Auf dieses Ergebnis aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Bedeutung von RAP2.12 für die Gärung, als zentralen Teil der pflanzlichen Hypoxieantwort, bei normalem und verringertem Sauerstoffgehalt näher untersucht.

##### 3.1.1 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Expression hypoxischer Markergene unter Normoxie

Unter Normoxie fand die Expression der hypoxischen Markergene *ADH1*, *PDC1*, *SUS4*, *AlaAT1* und *AlaAT2* in WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen auf basalem Level statt, lediglich die relative Transkriptmenge von *HB1* war in letzteren etwas erhöht (Abbildung 5 A und C). Im Vergleich dazu war die Expression aller getesteten hypoxischen Markergene in Pflanzen der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren bei Normoxie signifikant höher (Abbildung 5 A und C). So lag z.B. die relative Transkriptmenge von *ADH1* 440 x erhöht gegenüber der des WT bei gleichen Bedingungen vor, die von *PDC1* und *HB1* etwa 150 x erhöht. Bei Hypoxie stieg die Expression der hypoxischen Markergene (Abbildung 5 B und D) in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zur Normoxie nicht weiter an, mit Ausnahme von *PDC1*. Dagegen war sie in WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen unter diesen Bedingungen deutlich höher als unter Normoxie, wobei die Überexpressoren ausnahmslos mehr Transkript akkumulierten als der WT. Somit konnten die Ergebnisse von Licausi et al. (2011b) bestätigt werden. Interessanterweise war die Überexpression des vollständigen *RAP2.12* Gens in den Pflanzen deutlich stärker ausgeprägt als die der deletierten Form. So lag die relative Transkriptmenge des *RAP2.12* Gens in 35S::RAP2.12 Pflanzen unter Normoxie bei 61 x und in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen nur bei 23 x Transkriptmenge im Vergleich zum WT bei normalen Sauerstoffkonzentrationen (Abbildung 5 A). Unter Hypoxie, bei der sich die Transkriptmenge von *RAP2.12* in WT Pflanzen im Vergleich zur Normoxie verdoppelte, stieg diese auch in den 35S::RAP2.12 Pflanzen deutlich an (100 x Transkriptmenge; Abbildung 5 C), wohingegen sie in  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren im Vergleich zu normoxischen Bedingungen nicht verändert war.

## ERGEBNISSE



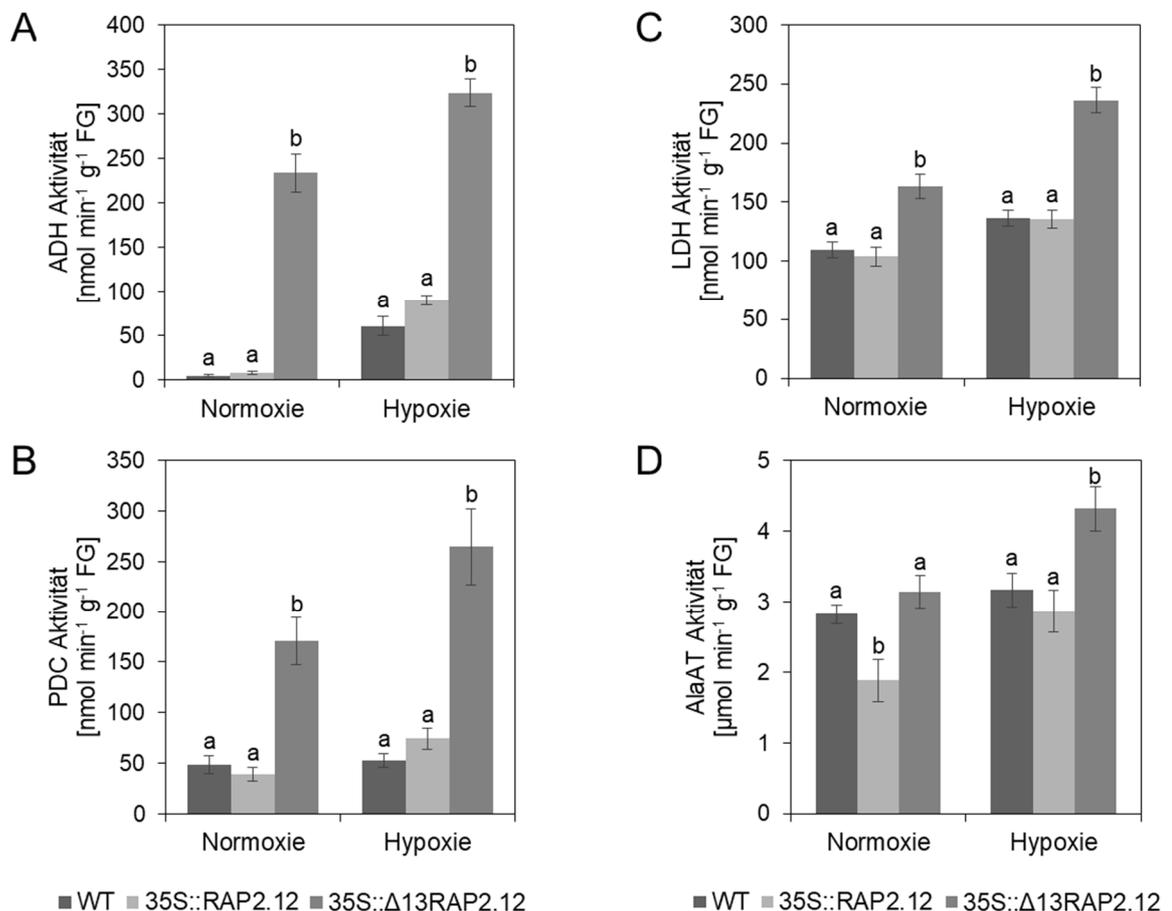
**Abbildung 5:** Relative Transkriptmengen hypoxischer Markergene in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagebedingungen wurden die Pflanzen im Dunkeln für 16 h entweder normalen (A und C) oder verringerten (B und D) Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und die Rosetten in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der RNA und Umschreiben dieser in cDNA wurden die relativen Transkriptmengen von *ADH1*, *PDC1*, *HB1*, *SUS4* und *RAP2.12* (A und B) bzw. von *AlaAT1* und *AlaAT2* (C und D) mittels qRT PCR bestimmt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 8 - 10$ ) mit Standardfehler nach Normalisierung auf die Werte des WT bei Normoxie. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA;  $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

### 3.1.2 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Aktivierung von Fermentationsenzymen unter Normoxie

Um zu überprüfen, ob sich die gesteigerte Transkriptmenge hypoxischer Markergene unter Normoxie in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen auch auf die Proteinebene auswirkt, wurde die maximale Aktivität der Fermentationsenzyme ADH, PDC, LDH und AlaAT bestimmt (Abbildung 6 A - D). Im Einklang mit den Ergebnissen auf mRNA Ebene (Abbildung 5) waren die maximalen Aktivitäten der Fermentationsenzyme unter Normoxie in  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren signifikant gegenüber 35S::RAP2.12 Pflanzen erhöht (Abbildung 6). Dies traf für die drei Schlüsselenzyme der alkoholischen und der Milchsäuregärung ADH, PDC und LDH ebenfalls im Vergleich zu WT Pflanzen zu. Unter hypoxischen Bedingungen war in Pflanzen der Kontrolllinien WT und 35S::RAP2.12 wie

## ERGEBNISSE

erwartet generell eine höhere maximale Aktivität der Fermentationsenzyme im Vergleich zu normoxischen Bedingungen zu verzeichnen. Dies galt vor allem für ADH und LDH (Abbildung 6 A und C) sowie im Falle von 35S::*RAP2.12* Pflanzen für AlaAT (Abbildung 6 D). Mit Ausnahme der maximalen Aktivität für AlaAT lagen die Werte der beiden Kontrolllinien bei Hypoxie allerdings unter den jeweiligen Werten der 35S::*Δ13RAP2.12* Pflanzen bei Normoxie (Abbildung 6 A - D). Interessanterweise war in diesen aber die maximale Aktivität aller getesteten Fermentationsenzyme unter hypoxischen Bedingungen trotz des hohen normoxischen Ausgangswerts nochmals deutlich erhöht. So lag sie z.B. für die Enzyme der alkoholischen Gärung (ADH und PDC; Abbildung 6 A und B) unter sauerstoffarmen Bedingungen um jeweils etwa 100 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> Frischgewicht (FG) höher im Vergleich zur Normoxie vor.

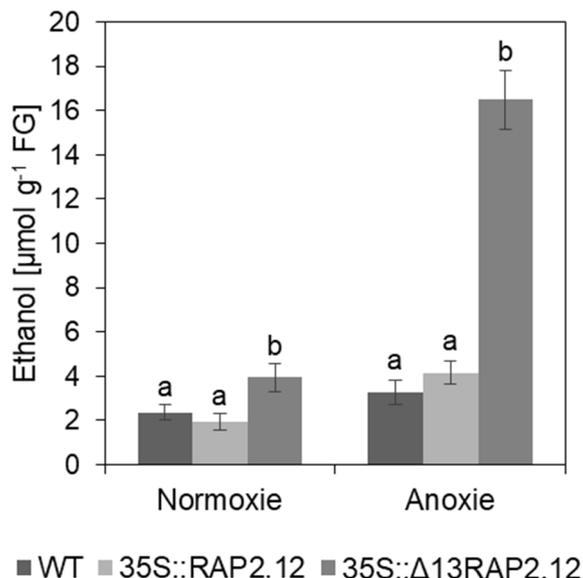


**Abbildung 6:** Maximale Aktivität von Fermentationsenzymen in WT, 35S::*RAP2.12* und 35S::*Δ13RAP2.12* Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen im Dunkeln für 16 h entweder normalen oder verringerten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und die Rosetten in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der Proteine wurde die maximale Aktivität der Fermentationsenzyme ADH (A), PDC (B), LDH (C) und AlaAT (D) durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch bestimmt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 8 - 10 für ADH, n = 6 für PDC, LDH und AlaAT) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

Um auszuschließen, dass die gemessenen Effekte auf die Expression hypoxischer Markergene und die Aktivität der Fermentationsenzyme in den 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen auf die Dunkelheit zurückzuführen sind, wurden vergleichend am Ende der Lichtperiode Proben genommen und die Messungen wiederholt. Die stark erhöhte Transkriptmenge der hypoxischen Markergene sowie die gesteigerte maximale Aktivität der Fermentationsenzyme konnte dabei in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu den Kontrolllinien auch unter Lichteinfluss beobachtet werden (Anhang Abbildung 1 und Anhang Abbildung 2). Der Einfluss des deregulierten RAP2.12 Transkriptionsfaktors auf die Gärung war also unabhängig vom Tageszeitpunkt und den vorherrschenden Lichtverhältnissen bei der Ernte des Pflanzenmaterials.

### 3.1.3 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Akkumulation von Gärungsprodukten unter Normoxie

Da die  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren auf Ebene der Genexpression und der Aktivitäten der Fermentationsenzyme schon bei Normoxie starke hypoxische Reaktionen zeigten, wurde auch die Akkumulation der Endprodukte der Gärung, Ethanol und Laktat, untersucht. Des Weiteren wurden die Mengen von Alanin und GABA analysiert, da diese Metabolite ebenfalls unter Hypoxie akkumulieren (Rocha et al., 2010) (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 7:** Ethanolgehalt in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie. Die Pflanzen wurden für eine Woche unter Langtagbedingungen in Flüssigkultur mit 30 mM Saccharose angezogen und dann für 16 h in Flüssigkultur mit 90 mM Saccharose normalen Sauerstoffkonzentrationen oder reinem Stickstoff ausgesetzt. Die dabei in der Lösung akkumulierte Ethanolmenge wurde dann photometrisch bestimmt. Der Graph zeigt die Mittelwerte (n = 25 - 35) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

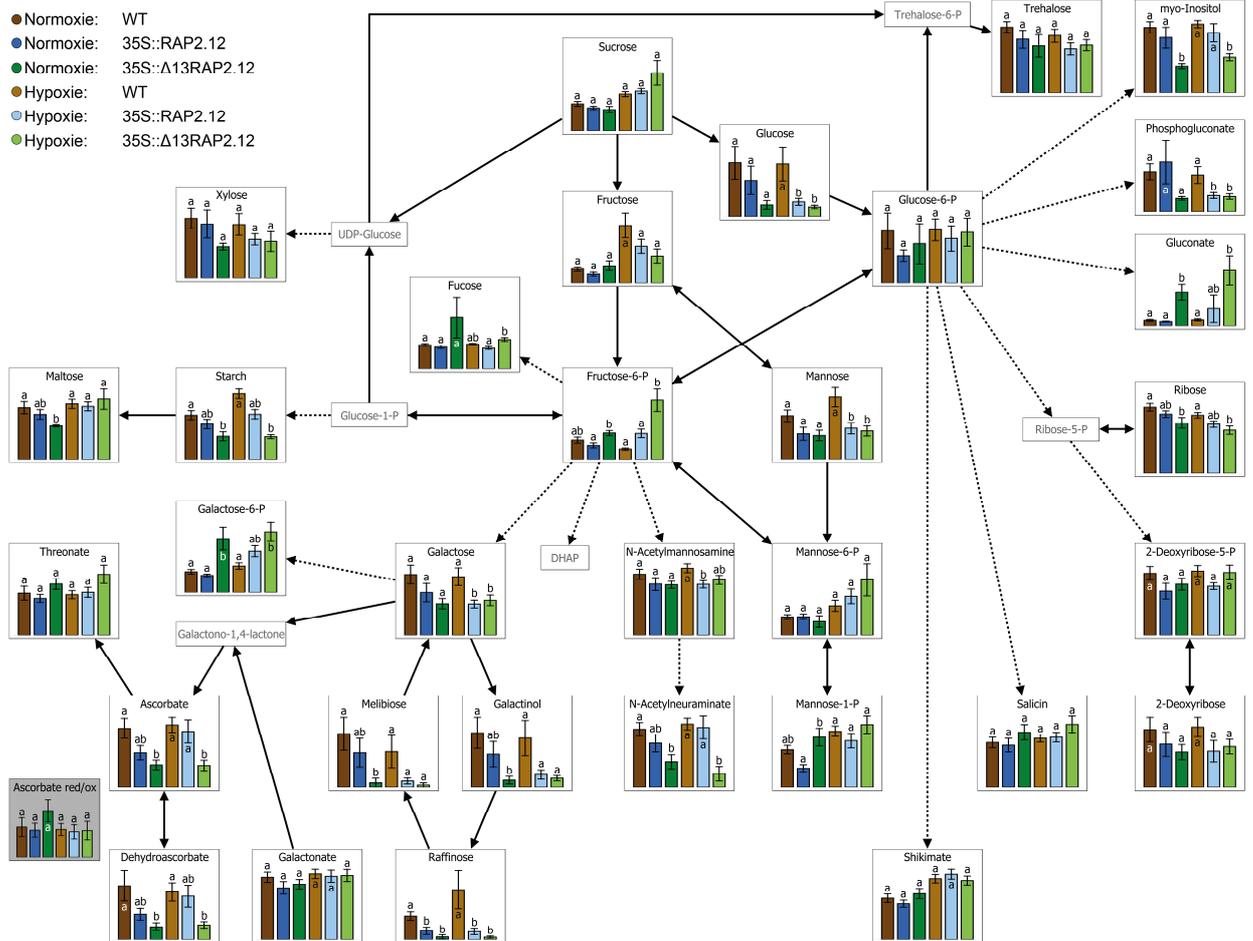
## ERGEBNISSE

Im Einklang mit den deutlich erhöhten Transkriptmengen sowie Enzymaktivitäten von ADH und PDC unter Normoxie in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen (Abbildung 5 A und Abbildung 6 A und B) war auch die Menge an produziertem Ethanol bei normalen Sauerstoffkonzentrationen signifikant höher als in WT oder 35S::RAP2.12 Pflanzen (Abbildung 7). Unter anoxischen Bedingungen fiel der Unterschied zu den Kontrolllinien sogar noch deutlicher aus. Während sich die Ethanolmenge in 35S::RAP2.12 Pflanzen bei Anoxie im Vergleich zu Normoxie etwa verdoppelte, vervierfachte sie sich in den Überexpressoren der deletierten RAP2.12 Form. Die Menge an produziertem Ethanol war in den Kontrolllinien unter diesen Bedingungen etwa auf dem Niveau der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren unter Normoxie (Abbildung 7). Auch Laktat (Abbildung 8 B unten) war in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei normalen Sauerstoffkonzentrationen signifikant stärker akkumuliert als in den Überexpressoren des vollständigen *RAP2.12* Gens. Bei Hypoxie nahm die Menge noch deutlich zu, wobei unter diesen Bedingungen auch 35S::RAP2.12 Pflanzen tendenziell mehr Laktat produzierten als der WT.

Alanin und GABA waren bei Normoxie in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu den Kontrolllinien ebenfalls stark akkumuliert (Abbildung 8 B unten und C unten). Unter Hypoxie nahm ihre Konzentration noch deutlich zu, sodass die  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren auch bei verringerten Sauerstoffkonzentrationen signifikant mehr Alanin bzw. GABA aufwiesen als WT oder 35S::RAP2.12 Pflanzen. Interessanterweise stieg in den Kontrolllinien lediglich die Menge an Alanin (Abbildung 8 B unten) unter Hypoxie im Vergleich zu normalen Sauerstoffkonzentrationen, nicht aber an GABA (Abbildung 8 C unten). So wurde für beide Linien bei Hypoxie bezüglich Alanin etwa der Wert von 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen unter normoxischen Bedingungen gemessen, für GABA war aber nur ein kleiner Anstieg in den Überexpressoren des vollständigen *RAP2.12* Gens zu verzeichnen. Damit blieben die Werte der Kontrolllinien für GABA bei verringerten Sauerstoffkonzentrationen deutlich unter dem der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie (Abbildung 8 C unten).

# ERGEBNISSE

## A Kohlenhydrat Metabolismus und Pentosephosphatweg



## B Glykolyse, Gärung, Serin- und Shikimatwege

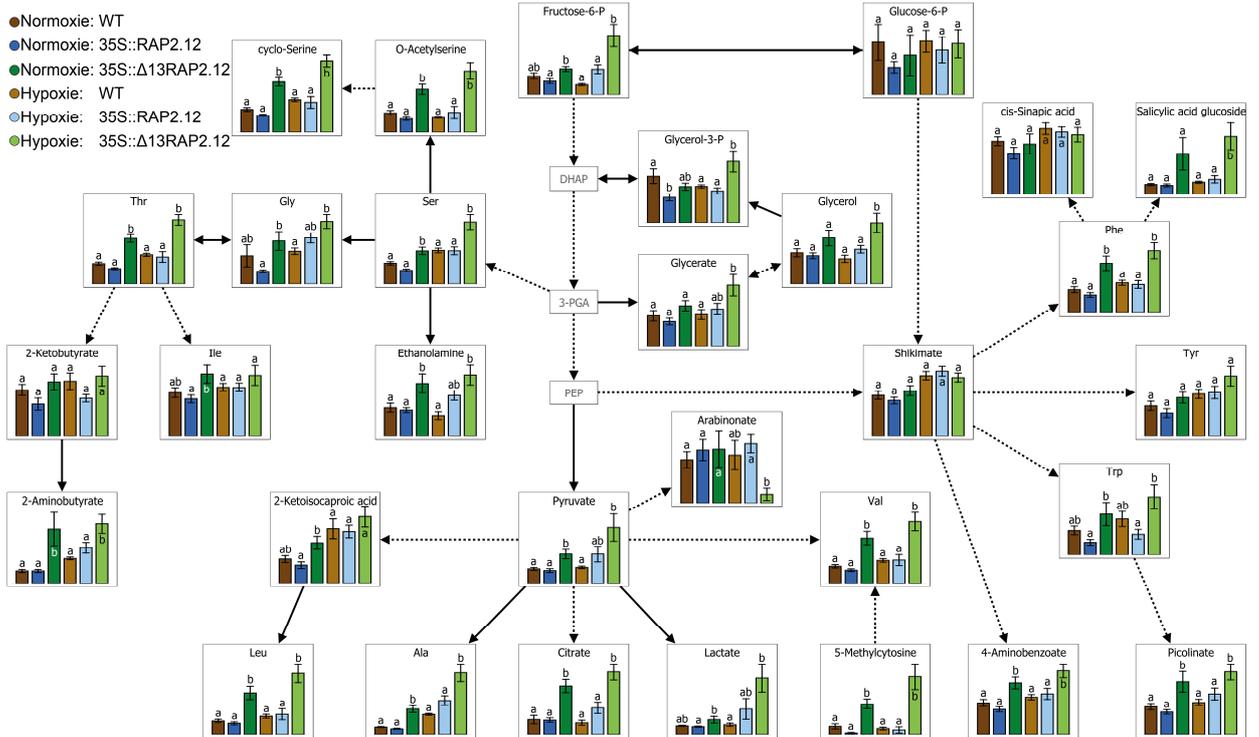
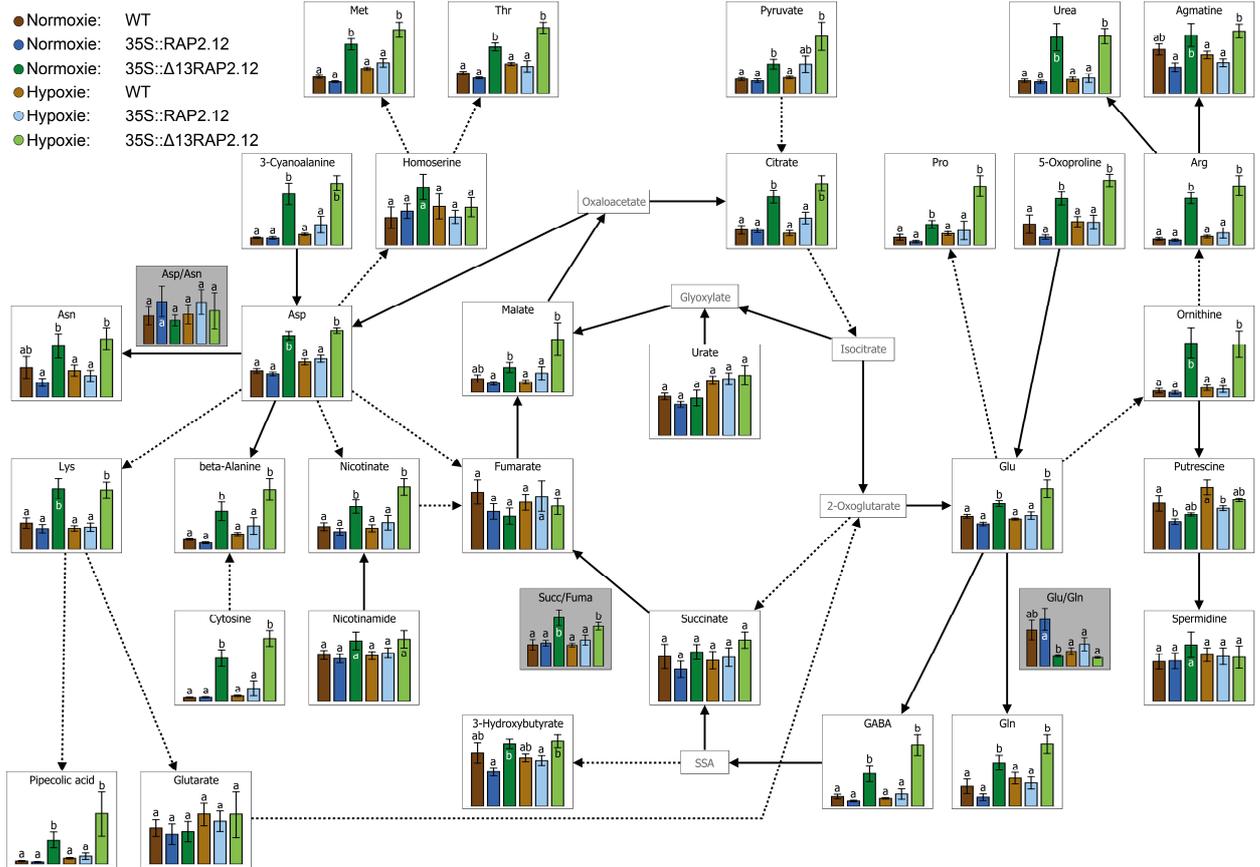


Abbildung 8: Fortsetzung und Legende auf der nächsten Seite

C Citratzyklus, Aspartat und Glutamat Metabolismus



**Abbildung 8:** Metabolitprofil von WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen im Dunkeln für 16 h entweder normalen oder verringerten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und die Rosetten in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der polaren Metabolite erfolgte deren Charakterisierung mittels GC-TOF-MS. Für die Quantifizierung der Stärke wurden nach deren Extraktion und enzymatischem Abbau die entstandenen Glukosemoleküle durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch quantifiziert. Die Darstellung der Daten erfolgte mit der Software VANTED (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam, Deutschland) und ist zur besseren Übersichtlichkeit in die drei Teile (A) Kohlenhydrat Metabolismus und Pentosephosphatweg, (B) Glykolyse, Gärung, Serin- und Shikimatwege und (C) Citratzyklus, Aspartat und Glutamat Metabolismus eingeteilt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 8 - 10) mit Standardfehler nach Normalisierung auf die Werte des WT bei Normoxie. In den grau hinterlegten Boxen sind Verhältnisse von Metaboliten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (p < 0,05) innerhalb derselben Sauerstoffkonzentration, wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. Die tabellarische Darstellung der Daten mit statistischer Analyse befindet sich in Anhang Tabelle 1.

### 3.2 Der Einfluss von RAP2.12 auf den Atmungsstoffwechsel bei normalem und verringertem Sauerstoffgehalt

Die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors RAP2.12 durch Deletion der 13 N-terminalen Aminosäuren führte zur konstitutiven Aktivierung hypoxischer Markergene und in der Folge zu aerober Gärung. Die Umstellung des Pflanzenstoffwechsels auf sauerstoffarme Bedingungen, welche markante Veränderungen nach sich zieht (António et al., 2016; Lakshmanan et al., 2013; Narsai et al., 2011; Rocha et al., 2010; van Dongen et al., 2009) (Abbildung 2), wurde im Folgenden untersucht.

#### 3.2.1 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu starken Veränderungen im Metabolitprofil

Vergleicht man die Metabolitprofile (Abbildung 8 und Anhang Tabelle 1) der drei untersuchten Genotypen, zeigen sich schon bei Normoxie drastische Änderungen im Metabolismus der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. So lag z.B. Stärke, als bedeutender Kohlenstoffspeicher, im Vergleich zu den beiden Kontrolllinien deutlich reduziert vor (Abbildung 8 A). Ebenso war die Menge einiger Zucker, darunter Glukose, Maltose, Melibiose und Ribose, deutlich verringert (Abbildung 8 A). Gluconsäure hingegen lag in  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren signifikant erhöht vor (Abbildung 8 A). Sowohl die Menge an Ascorbinsäure als auch an Dehydroascorbinsäure war deutlich verringert im Vergleich zu den Kontrolllinien, wodurch aber im Verhältnis der beiden Stoffe zueinander keine Änderung zwischen den Genotypen zu verzeichnen war (Abbildung 8 A). Ein interessantes Bild zeigte sich an den verschiedenen Stellen der Glykolyse: Die Menge des Ausgangsstoffs Glukose war in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu den Kontrolllinien verringert, von Glukose-6-Phosphat unverändert, von Fruktose-6-Phosphat leicht gesteigert und die Menge des Endprodukts Pyruvat signifikant erhöht (Abbildung 8 A und B). Dies deutet auf eine Stimulierung der Glykolyse hin. Die von der Glykolyse abgehenden Aminosäuren Valin, Leucin, Glycin und Serin, sowie die Formen O-Acetylserin und Cyclo-Serin, lagen in  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren ebenfalls signifikant erhöht vor (Abbildung 8 B). Insgesamt war die Menge der meisten Aminosäuren in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu den Kontrolllinien gesteigert, so auch derer, die im Zusammenhang mit dem Citratzyklus stehen, wie z.B. Asparaginsäure, Asparagin, Threonin, Cytosin, Lysin, Glutaminsäure, Glutamin, Prolin, Ornithin und Arginin (Abbildung 8 C). Dabei war das Verhältnis von Asparaginsäure zu Asparagin im Vergleich zwischen den drei Genotypen unverändert, das Verhältnis von Glutaminsäure zu Glutamin jedoch in den  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren im Vergleich zu WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen deutlich verringert (Abbildung 8 C). Im Citratzyklus selbst waren die Mengen an Citrat und Malat in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu den

Kontrolllinien erhöht, die an Succinat und Fumarat unverändert (Abbildung 8 C). Setzt man die Werte Letzterer jedoch zueinander ins Verhältnis, ist eine Verschiebung zur Seite Succinats in den  $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Überexpressoren zu verzeichnen. Diese Verschiebung ist charakteristisch für die Umstellung des Pflanzenmetabolismus, welche normalerweise unter hypoxischen Bedingungen auftritt, und spricht für eine Inhibierung der SDH-Funktion, was eine Gabelung des Citratzyklus sowie eine Inhibierung der Zellatmung zur Folge hat (António et al., 2016; Rocha et al., 2010).

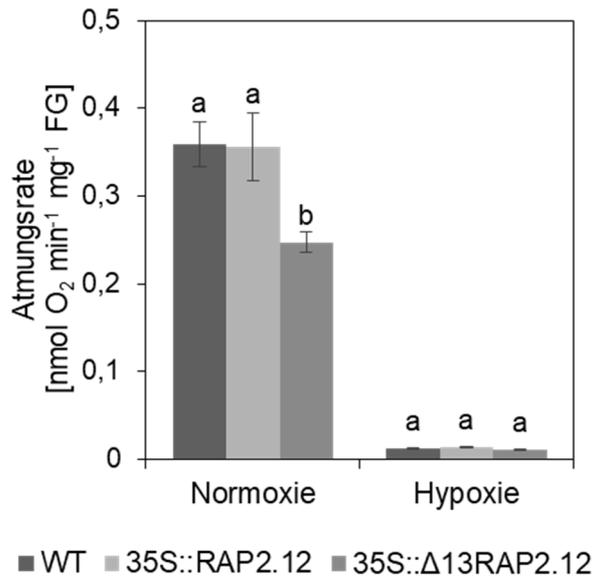
Bei Hypoxie blieb der signifikante Unterschied der  $35\text{S}::\Delta 13\text{RAP2.12}$  zu den beiden Kontrolllinien in der Regel bestehen, wobei sich aber oft die Werte der Überexpressoren des vollständigen *RAP2.12* Gens an die der  $35\text{S}::\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen annäherten (z.B. Glukose in Abbildung 8 A, Ethanolamin, Pyruvat und Citrat in Abbildung 8 B und C). Meist war die Zunahme der Aminosäuremengen unter Hypoxie in allen drei Genotypen zu verzeichnen, wobei die Werte für WT und  $35\text{S}::\text{RAP2.12}$  Pflanzen unter Hypoxie meist unter den Werten der  $35\text{S}::\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen bei Normoxie lagen (z.B. Methionin und Threonin; Abbildung 8 C). In Ausnahmefällen blieb die Menge an Aminosäuren unter Hypoxie in den Kontrolllinien aber auch auf normoxischem Niveau, während in den  $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Überexpressoren nochmals ein Anstieg zu verzeichnen war (z.B. 5-Methylcytosin in Abbildung 8 B, 5-Oxoprolin in Abbildung 8 C).

Interessanterweise waren auch die Mengen an Salicylsäureglucosid und Picolinsäure (Abbildung 8 B) sowie an Pipecolinsäure (Abbildung 8 C) in  $35\text{S}::\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie signifikant gegenüber den Kontrolllinien erhöht. Diese Stoffe spielen wichtige Rollen in Hormon-, Abwehr- und Immunantworten (Bernsdorff et al., 2016; Návarová et al., 2012; Zhang et al., 2004).

### 3.2.2 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu verringerten Atmungsraten unter Normoxie

Die Erhöhung des Verhältnisses von Succinat zu Fumarat in den  $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Überexpressoren unter normalen Sauerstoffbedingungen (Abbildung 8 C) könnte darauf hindeuten, dass die Zellatmung in diesen Pflanzen dauerhaft reduziert ist (António et al., 2016). Die Messung der Atmungsraten der drei Genotypen bestätigte diese Annahme (Abbildung 9). So war bei Normoxie die Atmungsrate in  $35\text{S}::\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen signifikant gegenüber WT und  $35\text{S}::\text{RAP2.12}$  Pflanzen verringert, deren Werte vergleichbar ausfielen. Unter Hypoxie war die Atmung in allen drei Genotypen stark reduziert, die Ergebnisse bewegten sich aber etwa auf dem gleichen Niveau.

## ERGEBNISSE

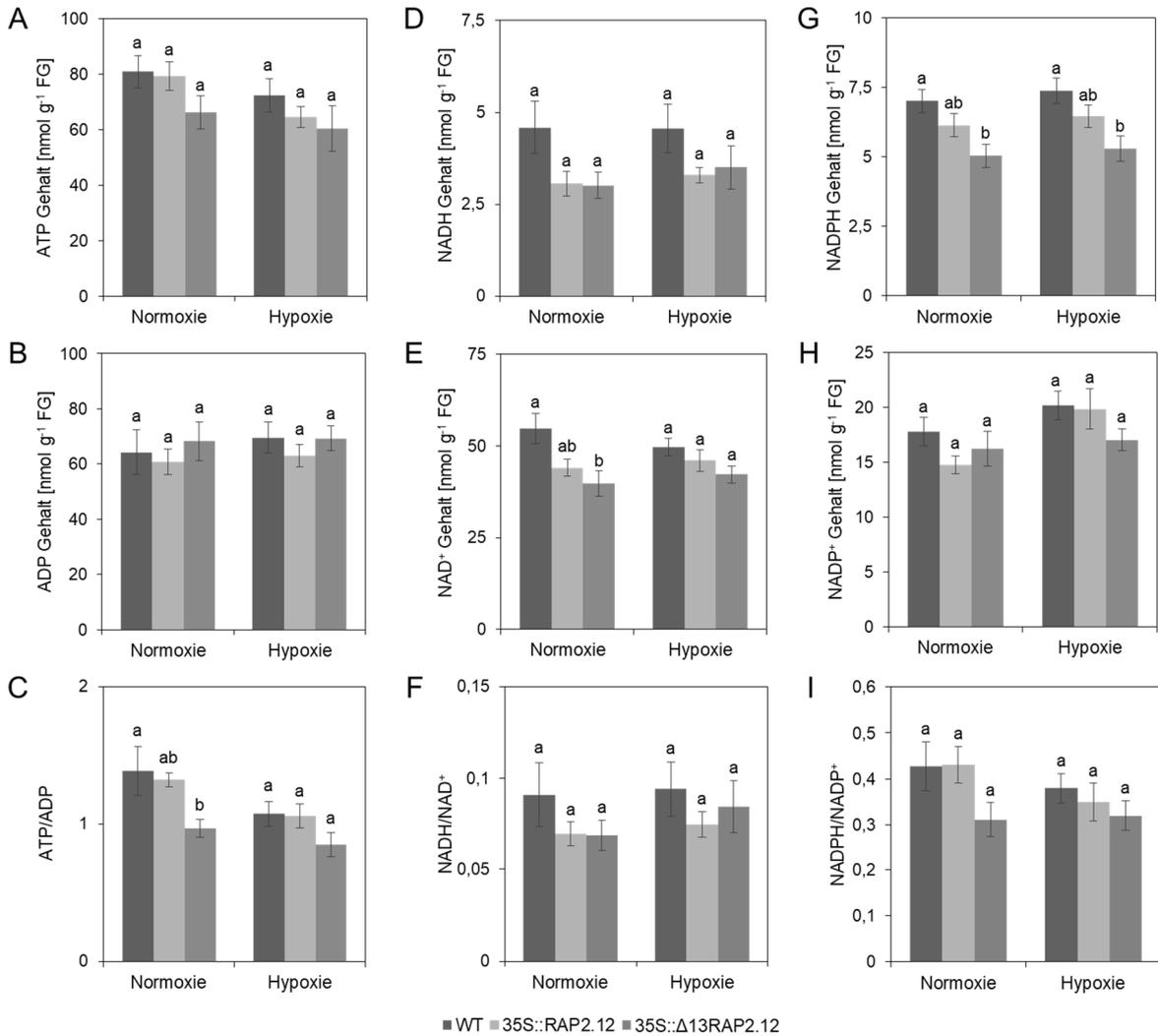


**Abbildung 9:** Atmungsraten in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden am Ende der Nacht mithilfe von Korkbohrern Blattscheiben ausgestochen, sodass alle Blattalter repräsentativ vertreten waren. Der Sauerstoffverbrauch der Blattscheiben wurde in luftdicht verschließbaren, mit Puffer gefüllten Glasgefäßen im Dunkeln bestimmt. Der Graph zeigt die Mittelwerte (n = 7 - 8) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

Um zu überprüfen, ob sich die verringerte Atmungsrate in Δ13RAP2.12 Überexpressoren bei normalen Sauerstoffbedingungen auch im Adenylatenergiestatus bemerkbar macht, wurden ATP und ADP in den Pflanzen quantifiziert und zueinander ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 10 A - C). Während die Konzentrationen von ADP sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie in den drei Genotypen vergleichbar waren (Abbildung 10 B), zeichnete sich im ATP Gehalt unter beiden Bedingungen eine Reduzierung in 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen ab (Abbildung 10 A). Dadurch war in diesen Pflanzen auch das Verhältnis von ATP zu ADP verringert, was auf ein Defizit im Adenylatenergiestatus hindeutet (Abbildung 10 C). Dabei war der Wert des ATP/ADP Verhältnisses unter Deregulation des RAP2.12 Transkriptionsfaktors bei Normoxie etwas niedriger als in den beiden Kontrolllinien unter Hypoxie.

Im weiteren Zusammenhang mit dem Energiehaushalt der Pflanzen wurden auch die Pyridinnukleotide NADH, NAD<sup>+</sup>, NADPH und NADP<sup>+</sup> (Abbildung 10 D, E, G und H) quantifiziert und die reduzierte zur oxidierten Form jeweils ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 10 F und I). Die Menge an NAD<sup>+</sup> war in 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen unter Normoxie im Vergleich zu WT Pflanzen signifikant verringert (Abbildung 10 E), das Verhältnis von NADH zu NAD<sup>+</sup> war aber in keinem der drei Genotypen signifikant verändert (Abbildung 10 F). Auch der NADPH Gehalt lag in 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie im Vergleich zu WT Pflanzen signifikant verringert vor (Abbildung 10 G). Dies führte in den Δ13RAP2.12 Überexpressoren zu einem tendenziell verringerten Verhältnis von NADPH zu NADP<sup>+</sup> unter Normoxie, welches aber nicht signifikant von denen der Kontrolllinien verschieden war (Abbildung 10 I).

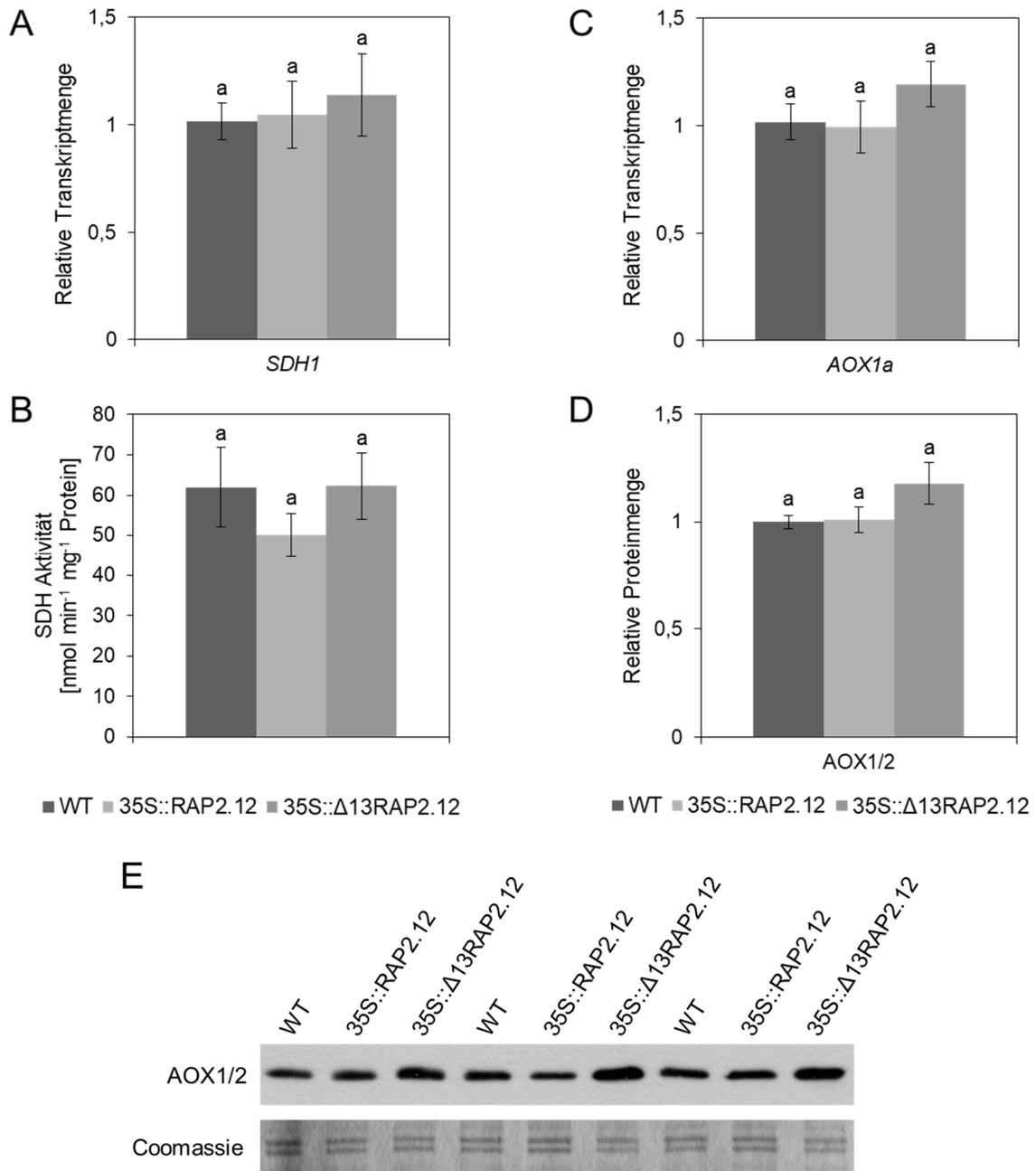
## ERGEBNISSE



**Abbildung 10:** Mengen und Verhältnisse von Adenosinphosphaten und Pyridinnukleotiden in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen im Dunkeln für 16 h entweder normalen oder verringerten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und die Rosetten in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion von ATP (A), ADP (B), NADH (D), NAD<sup>+</sup> (E), NADPH (G) und NADP<sup>+</sup> (H) wurden diese durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch quantifiziert. Des Weiteren wurden die Verhältnisse von ATP und ADP (C), NADH und NAD<sup>+</sup> (F) sowie NADPH und NADP<sup>+</sup> (I) gebildet. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 9 - 10) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

Sowohl die Erhöhung des Verhältnisses von Succinat zu Fumarat (Abbildung 8 C) als auch die Verringerung der Atmungsrate (Abbildung 9) in den  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren unter Normoxie deuteten darauf hin, dass in diesen Pflanzen die SDH in ihrer enzymatischen Aktivität inhibiert und damit der Citratzyklus verzweigt vorlag (António et al., 2016; Rocha et al., 2010). Allerdings konnte unter diesen Bedingungen weder in der Transkriptmenge von *SDH1* (Abbildung 11 A), noch in der maximalen SDH Enzymaktivität (Abbildung 11 B) ein Unterschied zwischen den drei Genotypen festgestellt werden.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 11:** Expressionslevel von *SDH1* (A) und *AOX1a* (C) sowie maximale SDH Enzymaktivität (B) und AOX Proteinmenge (D und E) in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie. A und C: Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden Pflanzen auf Erdkultur im Dunkeln für 16 h normalen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und die Rosetten in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der RNA und Umschreiben dieser in cDNA wurden die relativen Transkriptmengen von *SDH1* (A) und *AOX1a* (C) mittels qRT PCR bestimmt, wobei die Werte auf den WT normalisiert wurden. B, D und E: Nach 12 Tagen Wachstum in sterilen Halbflüssigkulturen unter Kurztagbedingungen wurden aus den Pflanzen Mitochondrien isoliert und ihre Konzentration mittels Bradford-Test bestimmt. 5 µg des mitochondrialen Proteins wurden eingesetzt, um die maximale SDH Enzymaktivität durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch zu bestimmen (B). 2,5 µg des mitochondrialen Proteins wurden eingesetzt, um mittels Western Blots die relative AOX Proteinmenge, bezogen auf den WT, zu ermitteln (D). E zeigt ein repräsentatives Bild des Western Blots. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 6) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

Ebenfalls aufbauend auf dem Befund der verringerten normoxischen Atmungsrate in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen (Abbildung 9) wurden die Gen- und die Proteinexpression der Alternativen Oxidase (AOX) untersucht (Abbildung 11 C - E). Zwar waren hierbei in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen sowohl die relative AOX1a Transkriptmenge (Abbildung 11 C) als auch die relative AOX1/2 Proteinmenge (Abbildung 11 D und E) im Vergleich zu den beiden Kontrolllinien leicht erhöht, jedoch war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

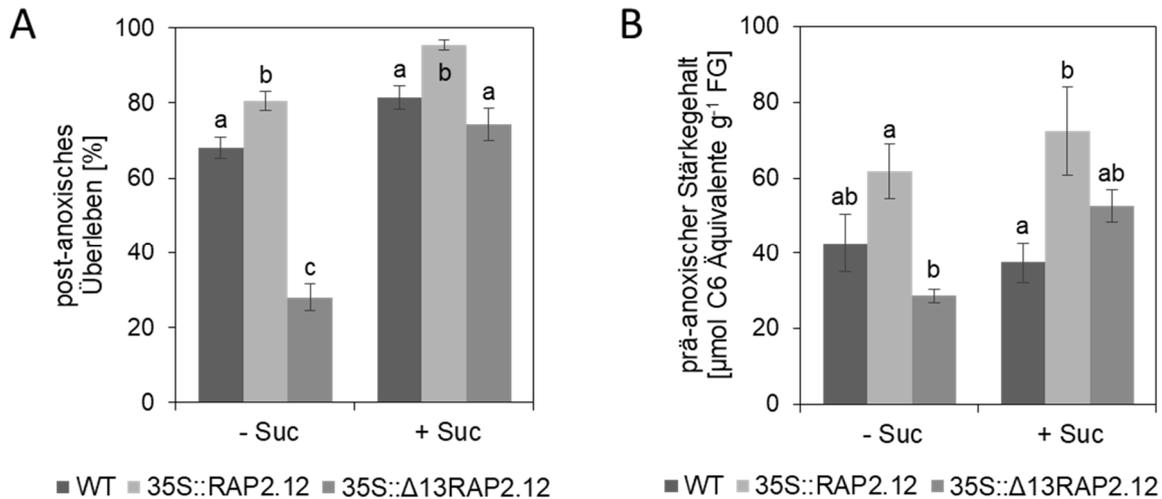
### 3.3 Der Einfluss von RAP2.12 auf Wachstum und Entwicklung bei verschiedenen Bedingungen

In der Publikation von Gibbs et al. (2011) wurde gezeigt, dass eine mutationsbedingte Abschaltung des NERP in Pflanzen zu einer höheren Überlebensrate nach anoxischer Behandlung führte. Im Gegensatz dazu wurde von Licausi et al. (2011b) zeitgleich publiziert, dass 35S::RAP2.12 Pflanzen nach Überflutung eine höhere Überlebensrate aufwiesen als der WT, 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen sowie die NERP KO-Mutanten *ate1ate2* und *prt6* jedoch eine deutlich schlechtere (siehe 1.5.1). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Publikationen ist allerdings, dass Licausi et al. (2011b) mit Erdkulturen arbeiteten, Gibbs et al. (2011) dagegen mit Plattenkulturen, in welchen Zucker beigemischt waren. Folglich wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Saccharose auf das post-anoxische Überleben der RAP2.12 Überexpressoren bestimmt.

#### 3.3.1 Die Korrelation von Stärkemangel und verringerter post-anoxischer Überlebensrate unter RAP2.12 Stabilisierung

Beim Vergleich der post-anoxischen Überlebensrate der drei Genotypen ohne und mit 30 mM Saccharose im Medium zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit des Überlebens der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen von der Zuckerkonzentration (Abbildung 12 A). So überlebten ohne Saccharose im Medium nur etwa 30 % der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren eine anoxische Behandlung, während die Rate beim WT etwa 70 % betrug. Unter Zuckerzugabe war die Überlebensrate der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen jedoch auf WT-Niveau. Überexpressoren des vollständigen RAP2.12 Gens zeigten ohne Zucker im Medium wie erwartet ein signifikant besseres post-anoxisches Überleben als der WT (Licausi et al., 2011b). Mit zusätzlich beigefügter Saccharose blieb dieser Trend bestehen. So lag die post-anoxische Überlebensrate in 35S::RAP2.12 Pflanzen mit Zuckerzugabe bei etwa 95 %, während sie bei WT Pflanzen und  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren etwa 80 % betrug (Abbildung 12 A).

## ERGEBNISSE



**Abbildung 12:** Post-anoxische Überlebensrate (A) und prä-anoxischer Stärkegehalt (B) in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen mit und ohne Zugabe von Saccharose. Nach einer Woche Wachstum auf sterilen Agarplatten ohne (- Suc) oder mit 30 mM Saccharose (+ Suc) unter Langtagbedingungen wurden die Pflanzen entweder anoxischen Bedingungen im Dunkeln ausgesetzt (A) oder die Rosetten zeitgleich in flüssigem Stickstoff geerntet (B). Die Begasungsdauer in A betrug 6,5 h (- Suc) bzw. 8 h (+ Suc), wobei nach einer weiteren Woche bei normalen Wachstumsbedingungen das post-anoxische Überleben der Pflanzen ermittelt wurde. Für B wurden nach Extraktion und enzymatischem Abbau der Stärke die entstandenen Glukosemoleküle durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch quantifiziert. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 10$  für die post-anoxische Überlebensrate,  $n = 5 - 6$  für den prä-anoxischen Stärkegehalt) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

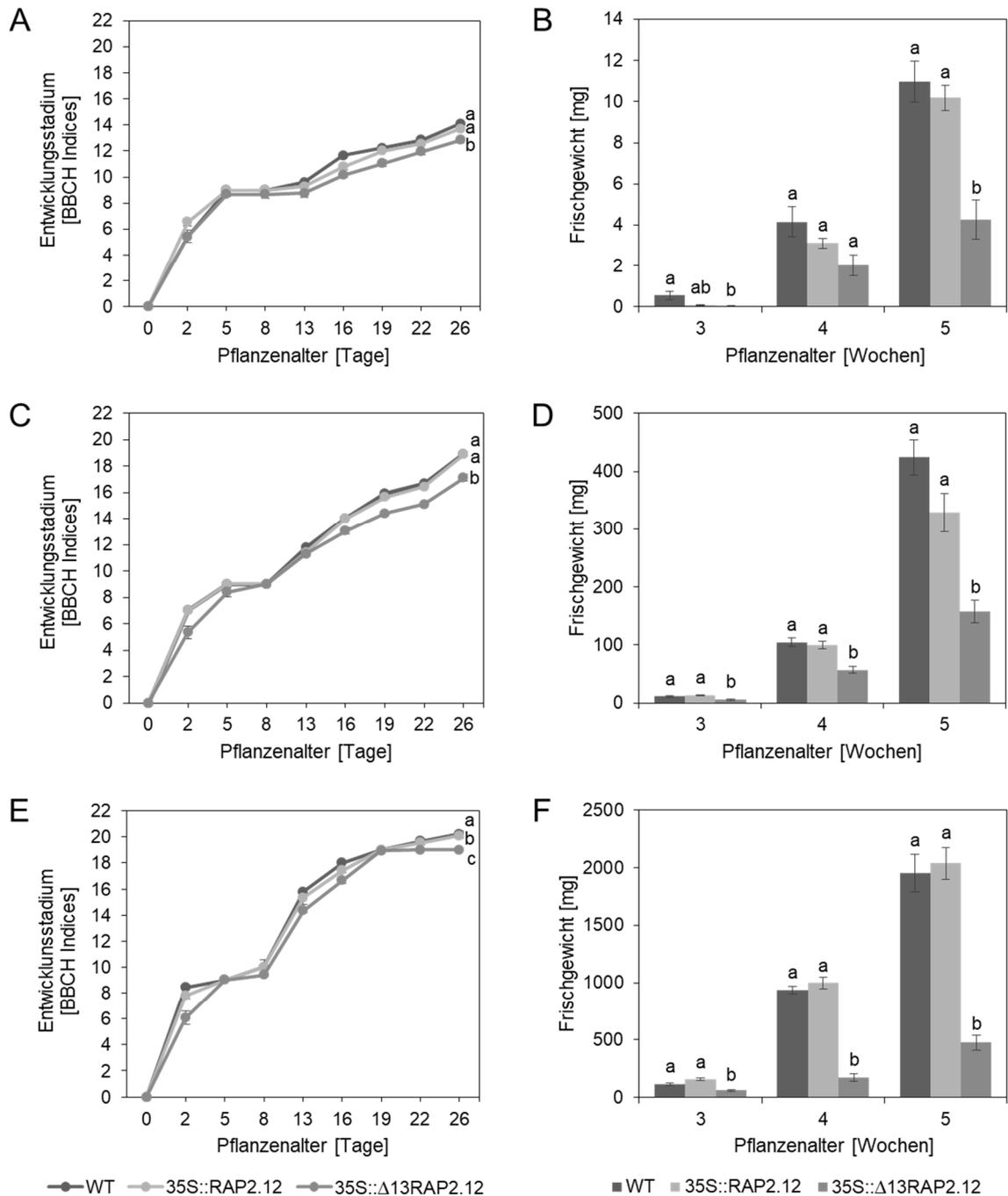
Die Wiederherstellung des post-anoxischen Überlebens von 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen auf WT-Niveau unter Saccharoseeinfluss lässt einen Mangel an Kohlenhydratreserven in diesen Pflanzen vermuten, welcher einen starken Einfluss auf die Überlebensrate hat. Auch im Metabolitprofil (Abbildung 8) war der Mangel des Kohlenhydratspeichers Stärke erkennbar. Deshalb wurde der Stärkegehalt in den drei Genotypen vor der anoxischen Behandlung überprüft. Tatsächlich zeigte sich, dass in Δ13RAP2.12 Überexpressoren ohne Saccharose im Medium verringerte Mengen an Stärke vorlagen, was sich jedoch durch die Zuckerzugabe änderte (Abbildung 12 B).

3.3.2 Die Auswirkungen der RAP2.12 Stabilisierung werden mit zunehmender Tageslänge markanter

Transitorische Stärke wird in photosynthetisch aktiven Blättern tagsüber gespeichert und nachts wieder abgebaut, um den Pflanzenstoffwechsel auch ohne Photosynthese mit Kohlenhydraten zu versorgen (Geiger und Servaites, 1994). Die Bedeutung der transitorischen Stärke für die Pflanzen nimmt daher mit zunehmender Tageslänge ab. Um den Stärkemangel in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen also zu kompensieren, wurden die Genotypen unter konstanter Belichtung angezogen und ihre Entwicklung nach dem BBCH-Index (Abbildung 13 E) sowie ihr Frischgewicht (Abbildung 13 F) bestimmt. Vergleichend erfolgte die Dokumentation auch für eine besonders kurze Belichtungsdauer von 4 h pro Tag (Abbildung 13 A und B) sowie für die normalen Kurztagebedingungen von 8 h Belichtung pro Tag (Abbildung 13 C und D), bei welchen alle Pflanzen auf Erdkulturen in den vorangegangenen Experimenten gewachsen waren. Dabei wurde erwartet, dass der Phänotyp der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren im Dauerlicht kompensiert werden kann und somit dem der beiden Kontrolllinien entspricht. Folglich sollte ihr Phänotyp also auch bei 4 h Belichtung pro Tag besonders drastisch im Vergleich zu dem der beiden Kontrolllinien ausfallen, da in dieser kurzen Belichtungsdauer nur relativ wenig Stärke für eine besonders lange Dunkelphase von 20 h akkumuliert werden kann.

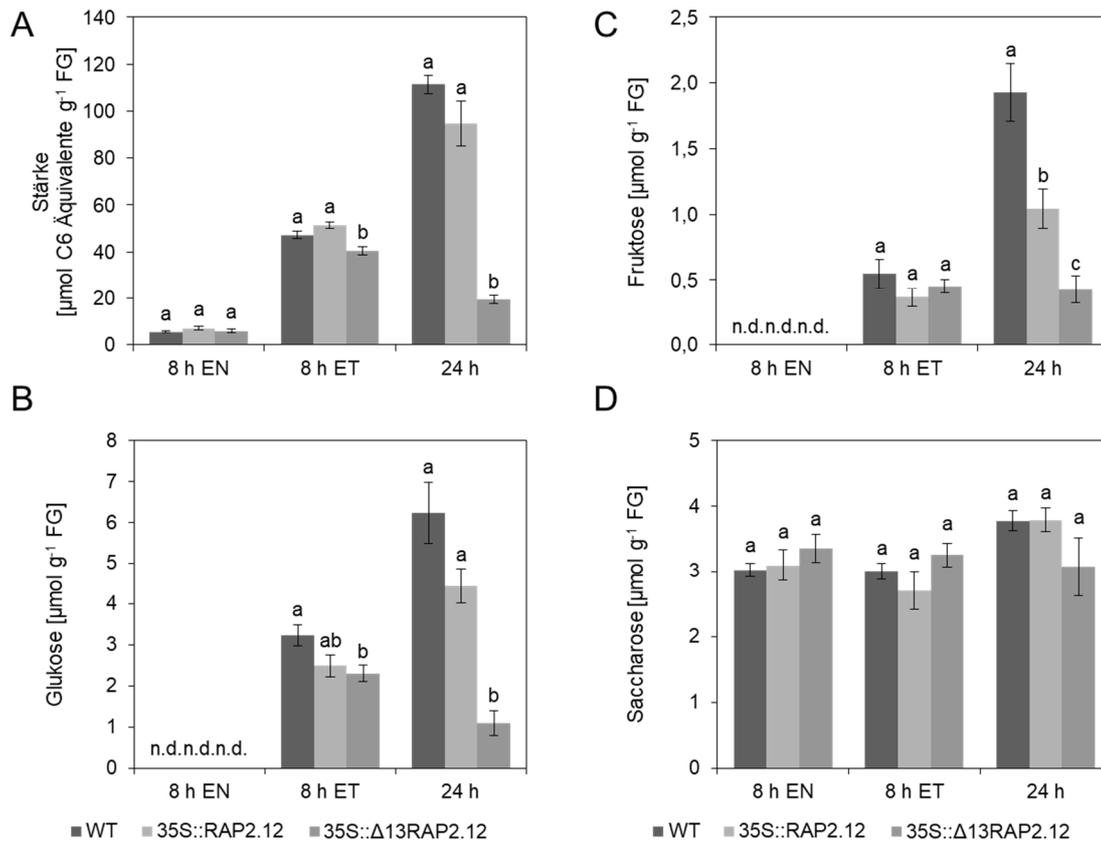
Interessanterweise fiel das Ergebnis sehr gegensätzlich zu den Erwartungen aus, da die Unterschiede der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen zu den Kontrolllinien mit zunehmender Tageslänge stärker wurden (Abbildung 13 und Anhang Abbildung 3). So zeigte sich bei der Dokumentation der Pflanzenentwicklung nach dem BBCH-Index (Abbildung 13 A, C und E), dass sich 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen stets langsamer entwickelten als WT oder 35S::RAP2.12 Pflanzen. Dieser Trend war dabei unabhängig von der Tageslänge. Bezüglich des Rosetten-Frischgewichts (Abbildung 13 B, D und F) zeichnete sich jedoch ab, dass die Unterschiede der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen zu den Kontrolllinien deutlicher ausfielen, je länger die Belichtungsdauer war. Während zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen messbar waren, betrug das Frischgewicht der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Rosetten bei einer täglichen Belichtungsdauer von 4 h (Abbildung 13 B) und von 8 h (Abbildung 13 D) etwa die Hälfte und im Dauerlicht (Abbildung 13 F) lediglich ein Viertel der Kontrolllinien. Das Ergebnis war dabei unabhängig vom Pflanzenalter.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 13:** Entwicklungsstadien und Rosetten-Frischgewichte von WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen bei verschiedenen Tageslängen. Die Dauer der täglichen Lichtperiode betrug dabei 4 h (A und B), 8 h (C und D) bzw. 24 h (E und F). Die Samen wurden auf Erde ausgebracht und das Wachstum der Pflanzen nach einer modifizierten Form des BBCH-Index jeden dritten bis vierten Tag dokumentiert (A, C und E), wobei ausschließlich die vegetative Wachstumsphase der Pflanzen berücksichtigt wurde. Nach 3, 4 und 5 Wochen wurden zusätzlich die Rosetten von Pflanzen abgeschnitten und ihr Frischgewicht bestimmt (B, D und F). Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 18 für Entwicklungsstadien, n = 5 - 6 für Frischgewichte) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller (A, C und E) bzw. einfaktorieller (B, D und F) ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. Repräsentative Fotos der Pflanzen nach 26 Tagen Wachstum bei den verschiedenen Tageslängen sind in Anhang Abbildung 3 dargestellt.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 14:** Stärke und lösliche Zucker in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen bei verschiedenen Tageslängen und zu verschiedenen Tageszeitpunkten. Die Dauer der täglichen Lichtperiode betrug dabei 8 h oder 24 h. Die Samen wurden auf Erde ausgebracht und die Rosetten nach 5 Wochen Wachstum in flüssigem Stickstoff geerntet, wobei die Ernte der Pflanzen bei 8 h Licht pro Tag am Ende der Nacht (EN) sowie am Ende des Tages (ET) erfolgte. Nach Extraktion der Stärke (A) und der löslichen Zucker Glukose (B), Fruktose (C) und Saccharose (D) wurden diese durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch quantifiziert, wobei Stärke dafür erst zu Glukose verdaut wurde. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 7 - 9$ ) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. n.d. = nicht detektierbar

Die Quantifizierung der Kohlenhydrate Stärke (Abbildung 14 A), Glukose (Abbildung 14 B) und Fruktose (Abbildung 14 C) in den Pflanzen unterstrich das Bild der Entwicklungs- und Frischgewichtsanalyse (Abbildung 13). Zwar konnte bei 4 h Belichtung pro Tag nicht genügend Frischgewicht für die Messung gesammelt werden, aber schon beim Vergleich der Ergebnisse bei täglichen Belichtungsdauern von 8 h und 24 h zeichnete sich ein klares Bild ab. So war der Stärke- und Glukosegehalt in den Δ13RAP2.12 Überexpressoren am Ende des Tages bei 8 h Licht gegenüber den Kontrolllinien deutlich verringert (Abbildung 14 A und B). Wie schon bei der Frischgewichtsanalyse fiel dieser Unterschied aber bei Dauerlicht noch wesentlich stärker aus (Abbildung 14 A - C). Übereinstimmend mit der GC-MS Analyse (Abbildung 8 A) lag zwischen den Genotypen jedoch kein Unterschied im Saccharosegehalt vor (Abbildung 14 D).

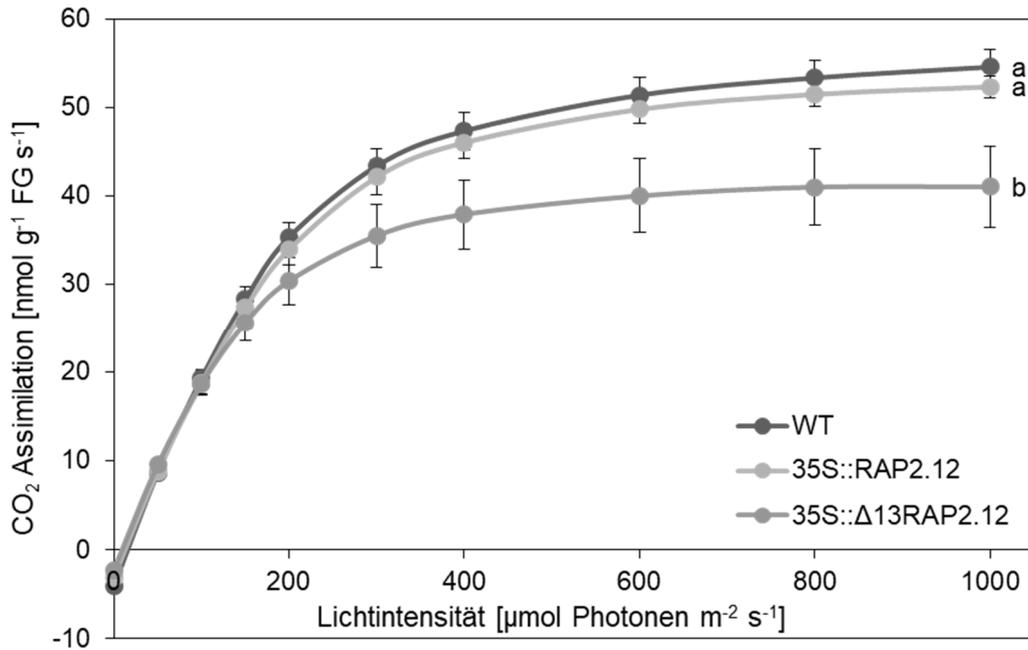
### 3.4 Der Einfluss von RAP2.12 auf die Photosynthese

Der Befund, dass sich bei Pflanzen mit dereguliertem RAP2.12 Transkriptionsfaktor unter konstanter Belichtung sowohl der Entwicklungsphänotyp verschärft als auch der Unterschied im Kohlenhydrathaushalt im Vergleich zu den Kontrolllinien drastischer wird, kann nicht ausschließlich durch den Abbau der Zucker unter aerober Gärung in diesen Pflanzen erklärt werden. Zwar wäre dann weiterhin eine reduzierte Menge an Kohlenhydraten zu erwarten, doch müsste die andauernde Produktion von Zuckern durch die laufende Photosynthese den Gärungsphänotyp eher kompensieren als ihn zu verstärken. Deshalb sollte nicht nur ein Unterschied im Abbau sondern auch im Aufbau von Zuckern in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen in Betracht gezogen werden. So wurden im Folgenden die CO<sub>2</sub> Assimilation und die PSII Quantenausbeute in den drei Genotypen näher untersucht, um mögliche Unterschiede in den grundlegenden Voraussetzungen für die *de novo* Synthese von Kohlenhydraten zu ermitteln.

#### 3.4.1 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Verringerung der CO<sub>2</sub> Assimilation

Die Untersuchung der CO<sub>2</sub> Assimilation zeigte, dass die  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren mit steigender Lichtintensität deutlich weniger CO<sub>2</sub> fixieren konnten als die beiden Kontrolllinien (Abbildung 15), welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Dieser Trend war auch schon bei einer Lichtintensität von 150  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erkennbar, was dem Wachstumslicht aller verwendeten Pflanzen von Erdkultur nahe kommt (160  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Ab einer Intensität von 600  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erreichte die CO<sub>2</sub> Assimilation von 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen ein Plateau, während sie in WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen bis zur höchsten untersuchten Lichtintensität von 1000  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  weiter anstieg (Abbildung 15). Die verringerte CO<sub>2</sub> Assimilation in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen wurde dabei nicht durch eine geringere Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> in den Blättern ausgelöst, stattdessen führte sie sogar zu einer Erhöhung der interzellulären CO<sub>2</sub> Konzentration im Vergleich zu den Kontrolllinien (Anhang Abbildung 4).

## ERGEBNISSE



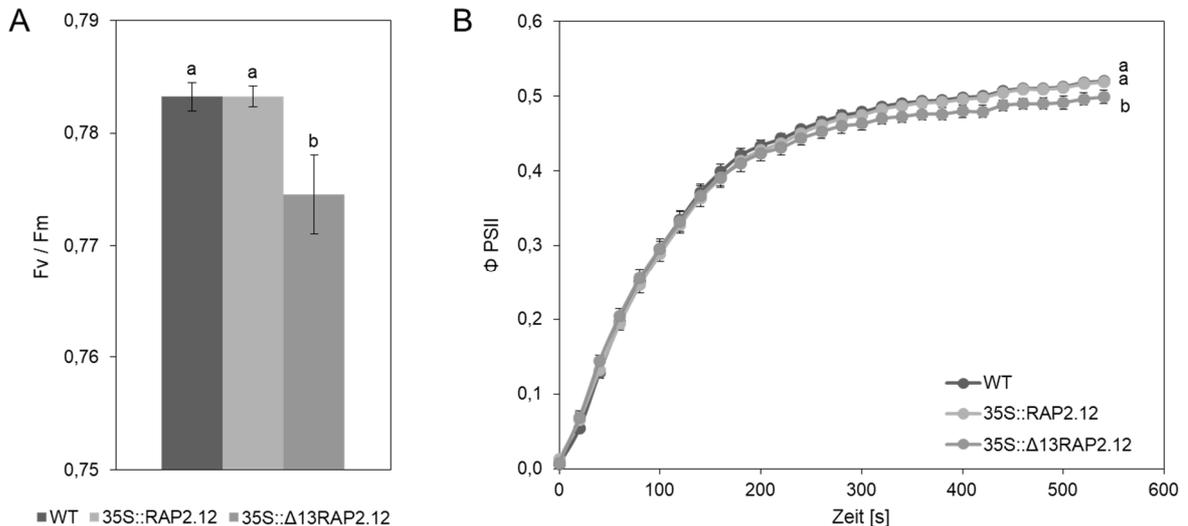
**Abbildung 15:** CO<sub>2</sub> Assimilation in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei verschiedenen Lichtstärken. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen nach Dunkeladaptation in einem Gaswechsel-Messgerät stärker werdenden Lichtintensitäten ausgesetzt, wobei jeweils nach Stabilisierung der Parameter die CO<sub>2</sub> Assimilation aufgezeichnet wurde. Der Graph zeigt die Mittelwerte (n = 5 - 6) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. Die interzelluläre CO<sub>2</sub> Konzentration wurde ebenfalls aufgezeichnet und ist in Anhang Abbildung 4 dargestellt.

### 3.4.2 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zur Verringerung der Quantenausbeute von Photosystem II

Bei Betrachtung der PSII Quantenausbeuten der drei untersuchten Genotypen waren die Werte der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen gegenüber WT Pflanzen und Überexpressoren des vollständigen *RAP2.12* Gens ebenfalls signifikant verringert (Abbildung 16). Das galt sowohl für die Messung der maximalen Quanteneffizienz Fv/Fm (Abbildung 16 A) als auch für die der effektiven Quantenausbeute  $\Phi$  PSII (Abbildung 16 B). Interessanterweise war der Anstieg von  $\Phi$  PSII zu Beginn der Lichtphase noch in allen drei Genotypen vergleichbar, aber nach etwa 3 min Belichtung flachte der Wert in den  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren zügiger ab als in den beiden Kontrolllinien, zwischen welchen kein Unterschied festgestellt wurde. Dabei betrug die Lichtintensität für die Ermittlung von  $\Phi$  PSII 145  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , was vergleichbar bzw. sogar etwas geringer als das Wachstumslicht aller verwendeten Pflanzen von Erdkultur ist (160  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Die Kurven der Quantenausbeuten der regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung  $\Phi$  NPQ sowie der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung  $\Phi$  NO verliefen für alle drei Genotypen sehr ähnlich (Anhang

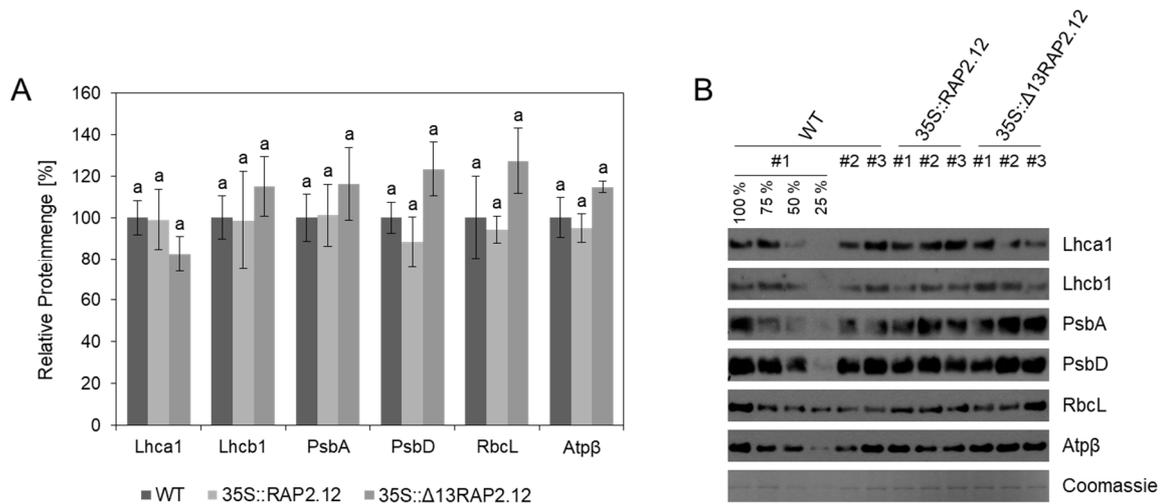
## ERGEBNISSE

Abbildung 5). Unter konstitutiver RAP2.12 Stabilisierung waren dabei die Werte für  $\Phi$  NPQ zu Beginn der Belichtungsphase etwas verringert. Für  $\Phi$  NO zeichneten sich in diesen Pflanzen leicht erhöhte Werte im Laufe der Messung ab, der Unterschied zu den Kontrolllinien war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 16:** Maximale (A) sowie effektive Quantenausbeute (B) des PSII in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen nach Dunkeladaptation in einem PAM Fluoreszenzspektrometer zur Ermittlung der maximalen Quanteneffizienz  $F_v/F_m$  (A) zunächst einem lichtsättigenden Puls ausgesetzt. Im Anschluss wurde alle 20 s die effektive Quantenausbeute  $\Phi$  PSII (B) bei einer dem Wachstumslicht ähnlichen Lichtintensität von  $145 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufgezeichnet. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 9 - 10$ ) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller (A) bzw. zweifaktorieller (B) ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. Die Quantenausbeuten der regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi$  NPQ) und der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi$  NO) wurden ebenfalls bestimmt und sind in Anhang Abbildung 5 dargestellt.

Um zu überprüfen, ob die Verringerung der PSII Quantenausbeuten in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen an einer Veränderung der Zusammensetzung des photosynthetischen Apparates liegt, wurden die relativen Mengen einiger Proteine überprüft, die im Zusammenhang mit der Photosynthese stehen. Dabei wurden Bestandteile der Lichtsammelkomplexe (Lhca1 und Lhcb1), des PSII (PsbA und PsbD), der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RbcL) sowie der ATP Synthase (Atp $\beta$ ) quantifiziert (Abbildung 17 A und B). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden.



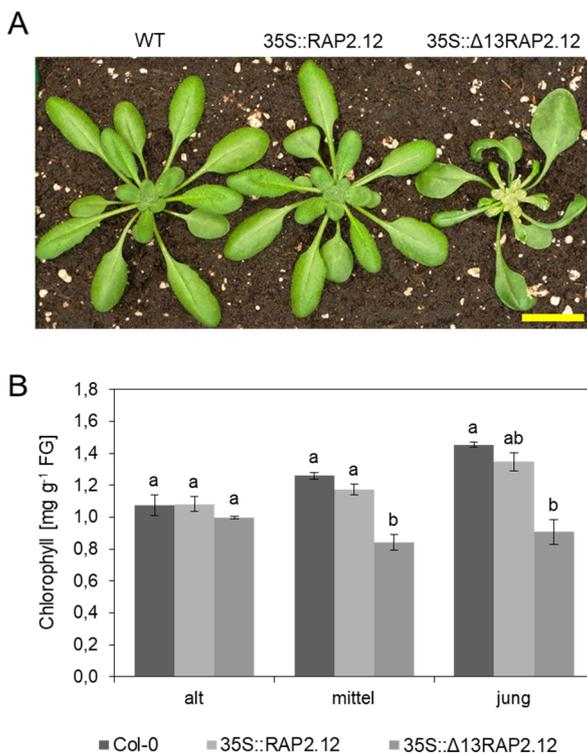
**Abbildung 17:** Relative Proteinmengen von Lhca1, Lhcb1, PsbA, PsbD, RbcL und Atpβ in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen, bezogen auf den WT. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Rosetten der Pflanzen abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der Proteine wurden die relativen Proteinmengen von Lhca1, Lhcb1, PsbA, PsbD, RbcL und Atpβ mittels Western Blots ermittelt. A zeigt die Mittelwerte (n = 5 - 6) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. B zeigt je ein repräsentatives Bild der Western Blots.

### 3.5 Untersuchung des Einflusses von RAP2.12 unter getrennter Beobachtung verschiedener Blattalter

In der Publikation von Giuntoli et al. (2017) konnte gezeigt werden, dass die Regulation des Transkriptionsfaktors RAP2.12 stark vom Alter der Pflanze abhängt. Während die hypoxische Stabilisierung der ERFVII Transkriptionsfaktoren und ihr NERP-abhängiger Abbau unter Normoxie erhalten bleiben, ist der Einfluss der ERFVII Aktivität auf die Genexpression in Keimlingen wesentlich höher als in adulten Pflanzen. Diese zusätzliche, altersabhängige Regulation hängt jedoch laut den Autoren auch mit dem N-Terminus zusammen, der in Δ13RAP2.12 Überexpressoren deletiert wurde. Aus diesem Grund wirkt sich die Deregulation des Transkriptionsfaktors in 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen mit zunehmendem Pflanzenalter stärker auf den Phänotyp aus, da die ERFVII Transkriptionsfaktoren nicht mehr so aktiv sein sollten (Giuntoli et al., 2017). Um den Einfluss der konstitutiven RAP2.12 Stabilisierung auf die Entwicklung verschieden alter Blätter näher zu untersuchen, wurden diese getrennt geerntet und charakterisiert. Dabei wurden speziell Faktoren berücksichtigt, die über den Entwicklungsstand der Blättchen Aufschluss geben (Schippers et al., 2016), wie z.B. die Chlorophyllsynthese, der Redoxzustand des Glutathionsystems oder Markergene eines Zellzyklusarrests.

3.5.1 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu verringertem Chlorophyllgehalt und oxidiertem Glutathionpool in jüngeren Blättern

Bei Betrachtung des Phänotyps der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen war schon mit bloßem Auge zu erkennen, dass die jüngeren Blätter in der Mitte der Rosetten blasser waren als die älteren Blätter (Abbildung 18 A). Zudem schien die Blattentwicklung etwa ab dem 5. echten Laubblatt gestört. So blieben die darauffolgenden Blätter relativ klein und die Oberfläche rollte sich ein. Bei den jüngsten Blättern entwickelte sich kein Petiolus mehr, wodurch sie sehr eng gedrängt im Zentrum der Rosette blieben. Bei 35S::RAP2.12 Pflanzen entwickelten sich alle Blätter vergleichbar zum WT, erreichten auch eine vergleichbare Größe und erschienen gleichmäßig grün (Abbildung 18 A). Die nach Blattalter separierte Ernte folgte für alle drei Genotypen der phänotypischen Analyse der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. So wurden die beiden Kotyledonen abgetrennt und die ersten vier echten Laubblätter, welche bei den  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren noch vergleichbar zum WT erschienen, als „alte“ Blätter geerntet. Die fünf darauffolgenden Blätter, welche sich bei 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen einrollten, aber in der Regel noch mit Petiolus wuchsen, wurden als „mittlere“ Blätter geerntet. Der restliche Teil der Rosette entsprach dann der Ernte als „junge“ Blätter.

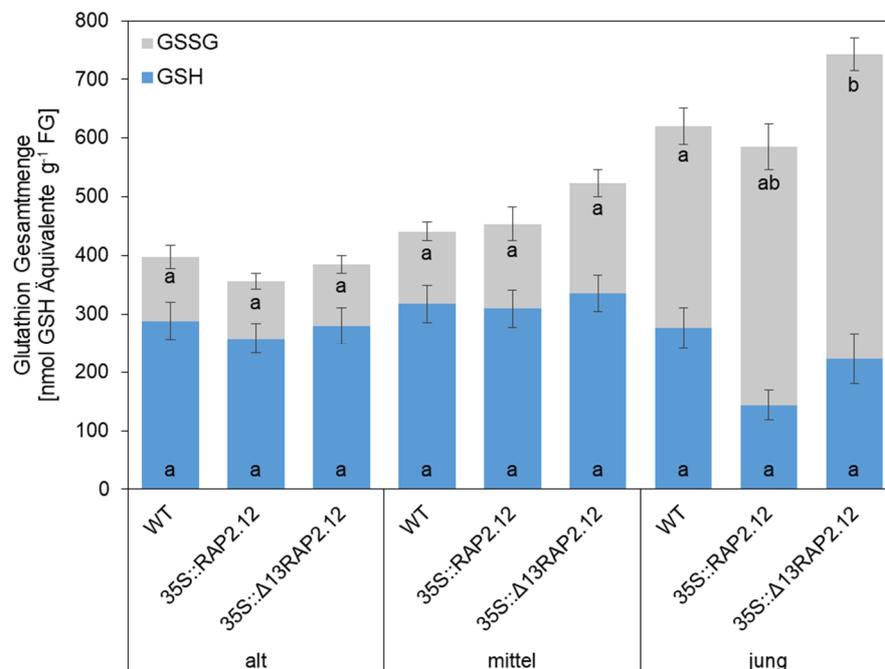


**Abbildung 18:** Phänotyp (A) sowie Chlorophyllgehalt (B) von Blättern verschiedenen Alters von WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Rosetten der Pflanzen (A) abgeschnitten und die Blätter nach Alter separiert in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurden die Blätter mit den Blattnummern 3 - 6 als alte, 7 - 11 als mittlere und alle darauffolgenden als junge Blätter definiert. Nach Extraktion des Chlorophylls erfolgte dessen Quantifizierung am Photometer (B). Der Graph zeigt die Mittelwerte (n = 6 - 8) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. A zeigt ein repräsentatives Bild der Rosetten jedes Genotyps vor der Ernte. Die Länge des gelben Balkens entspricht 2 cm.

Die Analyse der Chlorophyllmenge in den Blättern verschiedenen Alters bestätigte die Beobachtung, dass die Blätter im Zentrum der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Rosetten blasser waren als die der Kontrolllinien. So war in den alten Blättern im Vergleich zu WT und

35S::RAP2.12 Pflanzen kein Unterschied im Chlorophyllgehalt messbar, in den mittleren und jungen Blättern war die Chlorophyllmenge in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen gegenüber den Kontrolllinien jedoch deutlich reduziert (Abbildung 18 B).

Da die mittleren und jüngeren Blätter der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen kleiner (Abbildung 18 A) und dicker (Giuntoli et al., 2017) waren als die der Kontrolllinien, könnte in diesen Pflanzen der Übergang der Blattzellen von der Proliferations- in die Expansionsphase eingeschränkt gewesen sein (Schippers et al., 2016). Dieser geht mit der Differenzierung der Proplastiden zu Chloroplasten einher (Andriankaja et al., 2012), was die Bildung von Chlorophyll inkludiert. Die verringerte Chlorophyllmenge in den mittleren und jungen Blättern der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren (Abbildung 18 B) würde diese These also unterstützen. Ein weiterer wichtiger Faktor für den Übergang von der Zellproliferation zur -expansion ist Glutathion, das neben seiner Funktion als Antioxidans auch an der Regulation des Zellzyklus (Díaz-Vivancos et al., 2010; Pellny et al., 2009) sowie am retrograden Signalweg von Chloroplasten zum Zellkern (Shapiguzov et al., 2012) beteiligt ist. Deshalb wurde im Folgenden sowohl die Menge der reduzierten Form von Glutathion GSH als auch die der oxidierten Form GSSG in den drei Genotypen bestimmt. Dabei unterschied sich die GSH Menge in keinem der untersuchten Blattalter signifikant voneinander, der GSSG Gehalt war jedoch in den jungen Blättern der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen stark erhöht (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Menge an oxidiertem (GSSG) und reduziertem (GSH) Glutathion in Blättern verschiedenen Alters von WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Rosetten der Pflanzen abgeschnitten und die Blätter nach Alter separiert in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurden die Blätter mit den Blattnummern 3 - 6 als alte, 7 - 11 als

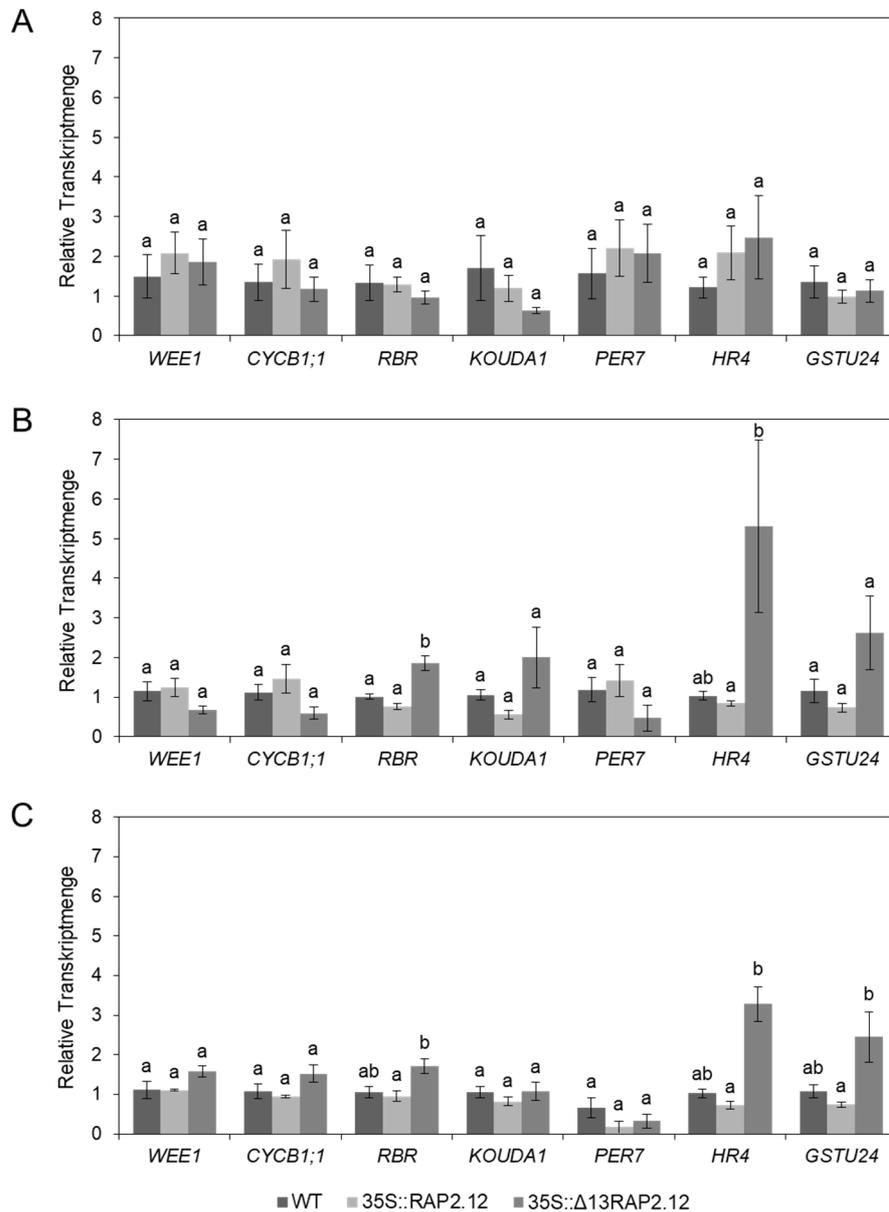
mittlere und alle darauffolgenden als junge Blätter definiert. Nach Extraktion des Glutathions wurden dessen Gesamtmenge sowie der Anteil des oxidierten Glutathions durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Menge an reduziertem Glutathion errechnet. Der Graph zeigt die Mittelwerte (n = 5) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

### 3.5.2 Die Stabilisierung von RAP2.12 führt zu erhöhter Expression verschiedener Stressgene in jüngeren Blättern

Aufbauend auf den Befund, dass in jungen Blättern der  $\Delta 13$ RAP2.12 Überexpressoren im Vergleich zu den Kontrolllinien eine erhöhte Menge an GSSG vorlag (Abbildung 19), wurden die Transkriptmengen der Markergene für Zellzyklusregulation *WEE1 KINASE* (*WEE1*), *CYCLIN B1;1* (*CYCB1;1*) und *RETINOBLASTOMA RELATED* (*RBR*) sowie für oxidativen Stress *HOMOLOG OF RPW8 4* (*HR4*) und *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 24* (*GSTU24*) (Giuntoli et al., 2017) untersucht (Abbildung 20). *WEE1* und *CYCB1;1* sind dabei Markergene für einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase (De Schutter et al., 2007), *RBR* erfüllt mehrere Funktionen im Zusammenhang mit der Zellproliferation und -differenzierung sowie dem Erhalt der Genomintegrität (Horvath et al., 2017) und führt je nach Phosphorylierungsstatus des Proteins entweder zu einer anhaltenden Zellproliferation oder ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest, jedoch in der G1-Phase (Harashima und Sugimoto, 2016). Die Expression von *CYCB1;1* und *RBR* ist dabei über TEOSINTE BRANCHED1-CYCLOIDEA-PROLIFERATING CELL FACTOR1 (*TCP*) Transkriptionsfaktoren gesteuert, welche direkt durch Glutathion reguliert sind (Viola et al., 2013; Li et al., 2012). Des Weiteren wurden die Transkriptmengen von *KUODA1* und *PER7* überprüft, die Markergene für die Zellexpansion darstellen. *PER7* ist eine der Peroxidasen, die an der Zellwand lokalisiert sind und unter  $H_2O_2$  Verbrauch Verzweigungen einfügen, welche die Zelle in ihrer Größe halten (Kärkönen und Kuchitsu, 2015). Während der Zellexpansion wird durch die gesteigerte Expression von *KUODA1* die Transkription von *PER7* gehemmt, sodass die Zelle wachsen kann (Lu et al., 2014). Wie schon beim Chlorophyllgehalt (Abbildung 18 B) und bei der Glutathionmenge (Abbildung 19) lagen in den alten Blättern bezüglich aller überprüften Markergene keine Unterschiede zwischen den Genotypen vor (Abbildung 20 A). Bei den mittleren und jungen Blättern waren jedoch die relativen Transkriptmengen von *RBR*, *HR4* und *GSTU24* in 35S: $\Delta 13$ RAP2.12 Pflanzen erhöht gegenüber WT Pflanzen und Überexpressoren des vollständigen *RAP2.12* Gens (Abbildung 20 B und C). Nur die Expression von *RBR*, aber von keinem der beiden anderen Zellzyklusarrest-Markergene *WEE1* und *CYCB1;1* war signifikant verändert. Sie verhielten sich zwar gleich, nämlich tendenziell reduziert in mittleren und erhöht in jungen Blättern, aber diese Unterschiede waren nicht signifikant.

## ERGEBNISSE

Gleichermaßen ergänzten sich die relativen Transkriptmengen von *KUODA1* und *PER7* in den mittleren Blättern der  $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Überexpressoren, mit tendenziell erhöhten Werten für *KOUODA1* und eher verringerten für *PER7* (Abbildung 20 B) im Vergleich zu den Kontrolllinien. Allerdings waren auch diese Unterschiede nicht signifikant.



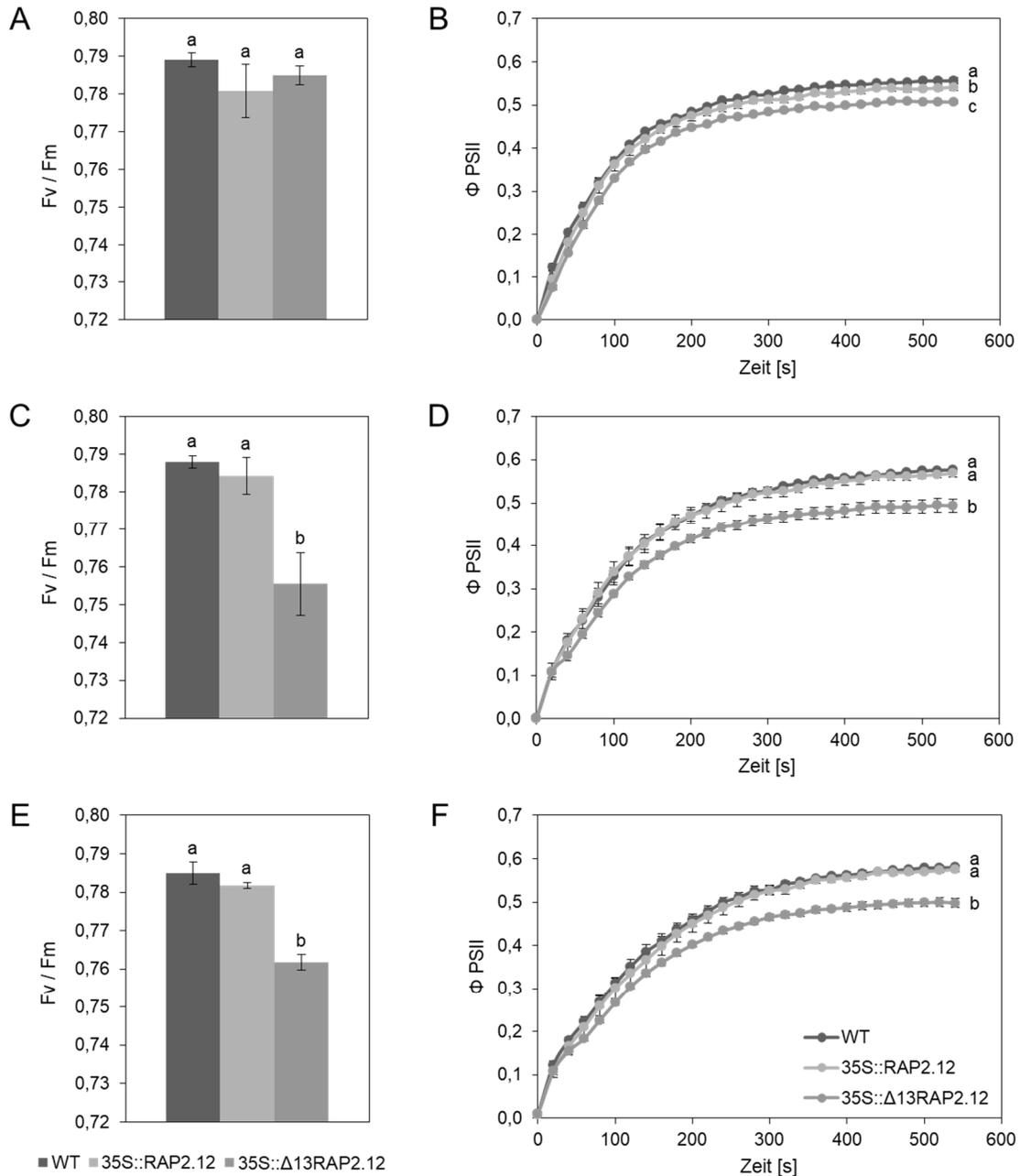
**Abbildung 20:** Relative Transkriptmenge von Markergenen für Zellzyklusregulation (*WEE1*, *CYCB1;1*, *RBR*), Zellelongation (*KUODA1*, *PER7*) und oxidativen Stress (*HR4*, *GSTU24*) in alten (A), mittleren (B) und jungen (C) Blättern von WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Rosetten der Pflanzen abgeschnitten und die Blätter nach Alter separiert in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurden die Blätter mit den Blattnummern 3 - 6 als alte, 7 - 11 als mittlere und alle darauffolgenden als junge Blätter definiert. Nach Extraktion der RNA und Umschreiben dieser in cDNA wurden die relativen Transkriptmengen von *WEE1*, *CYCB1;1*, *RBR*, *KUODA1*, *PER7*, *HR4* und *GSTU24* mittels qRT PCR bestimmt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 5) mit Standardfehler nach Normalisierung auf die Werte des WT im jeweiligen Blattalter. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

3.5.3 Die Verringerung der Quantenausbeute von Photosystem II unter RAP2.12 Stabilisierung ist in jüngeren Blättern ausgeprägter

Nachdem sich in den vorangegangenen Experimenten zu verschiedenen Blattaltern abzeichnete, dass die mittleren und insbesondere die jungen Blätter der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen eine Störung in der Zellentwicklung aufweisen könnten, wurde die Messung der PSII Quantenausbeute unter diesem Gesichtspunkt nach Blattalter getrennt wiederholt (Abbildung 21). Außerdem bewirkt oxidativer Stress, der sich in diesen Pflanzen ebenfalls abzeichnete (Abbildung 19 und Abbildung 20), oft eine Verringerung der maximalen Quanteneffizienz  $F_v/F_m$  (Zwack et al., 2016; Xia et al., 2009; Iannelli et al., 1999). Tatsächlich unterschied sich die maximale Quanteneffizienz  $F_v/F_m$  in den alten Blättern der drei Genotypen nicht (Abbildung 21 A), wohingegen sie in den mittleren und jungen Blättern der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren signifikant gegenüber WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen verringert war (Abbildung 21 C und E). Die effektive Quantenausbeute  $\Phi$  PSII unterschied sich in den alten Blättern zwischen allen Genotypen (Abbildung 21 B), wobei aber der Verlauf der Kurven und die erreichten Endwerte vergleichbar waren. In den mittleren und jungen Blättern von 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen war jedoch der Verlauf der Kurven deutlich flacher und die Endwerte deutlich niedriger als die der beiden Kontrolllinien (Abbildung 21 D und F). Die Verringerung der effektiven PSII Quantenausbeute in diesen Blättern zog eine Steigerung sowohl der regulierten als auch der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung nach sich (Anhang Abbildung 6). In den mittleren und jungen Blättern der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen konnte also deutlich weniger Lichtenergie photochemisch genutzt werden als in den Kontrolllinien.

Da es sich bei der Messung der Quantenausbeute um relative Werte handelt, welche auf den Chlorophyllgehalt bezogen sind, beeinflusste dessen Verringerung (Abbildung 18 B) das Ergebnis nicht.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 21:** Maximale (A, C und E) sowie effektive Quantenausbeuten (B, D und F) des PSII in alten (A und B), mittleren (C und D) und jungen (E und F) Blättern von WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen nach Dunkeladaptation in einem PAM Fluoreszenzspektrometer zur Ermittlung der maximalen Quanteneffizienz  $F_v/F_m$  (A, C und E) zunächst einem lichtsättigenden Puls ausgesetzt. Im Anschluss wurde alle 20 s die effektive Quantenausbeute  $\Phi_{PSII}$  (B, D und F) bei einer dem Wachstumslicht ähnlichen Lichtintensität von  $145 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufgezeichnet. Die Messpunkte wurden entsprechend des Blattalters gesetzt, dabei entsprachen Blätter mit den Blattnummern 3 - 6 alten, 7 - 11 mittleren und alle darauffolgenden jungen Blättern. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 5 - 7$ ) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller (A, C und E) bzw. zweifaktorieller (B, D und F) ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. Die Quantenausbeuten der regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi_{NPQ}$ ) und der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi_{NO}$ ) wurden ebenfalls bestimmt und sind in Anhang Abbildung 6 dargestellt.

## 4 Diskussion

Die hypoxische Genexpression in Landpflanzen wird maßgeblich durch ERFVII Transkriptionsfaktoren reguliert, die nur unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen stabil und damit aktiv vorliegen, da sie aufgrund ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz bei Anwesenheit von Sauerstoff proteasomal abgebaut werden (Kosmacz et al., 2015; Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011) (siehe 1.3.2). Einer der initialen ERFVII Transkriptionsfaktoren ist RAP2.12, dessen Funktion in bisherigen Studien hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene analysiert wurde (Bui et al., 2015; Kosmacz et al., 2015; Giuntoli et al., 2014; Licausi et al., 2011b). Die Auswirkungen der RAP2.12 Aktivität auf den Stoffwechsel wurden meist jedoch nicht weiter behandelt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, wie sich die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors RAP2.12 auf die Regulation des Pflanzenmetabolismus auswirkt. Die Stabilisierung war hierfür durch Deletion des sauerstoffsensitiven N-Terminus auch unter Normoxie gegeben (Licausi et al., 2011b). Dabei zeigte sich, dass der gesamte Pflanzenstoffwechsel auch bei normalen Sauerstoffkonzentrationen auf hypoxische Bedingungen eingestellt war, was eine verringerte Atmungsrate, aerobe Gärung und verringerte Mengen an Kohlenhydraten zur Folge hatte. Zusätzlich war der photosynthetische Aufbau von Kohlenhydraten verringert, was in Summe zu einer deutlich reduzierten post-anoxischen Überlebensrate führte. Der Befund, dass die Auswirkungen der RAP2.12 Stabilisierung insbesondere junge Blätter adulter Pflanzen betrafen, könnte außerdem auf einen Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die Zellentwicklung hindeuten, der vom Pflanzenalter abhängt.

### 4.1 Die Stabilisierung von RAP2.12 reguliert die Umstellung des Metabolismus auf hypoxische Bedingungen

Die Umstellung des Pflanzenstoffwechsels auf verringerte Sauerstoffkonzentrationen führt zu markanten Veränderungen im Metabolitprofil (António et al., 2016; Narsai et al., 2011; Rocha et al., 2010; van Dongen et al., 2009). Diese zeichnen sich vor allem durch eine Akkumulation von organischen Säuren und Aminosäuren aus (António et al., 2016; Narsai et al., 2011), was auch im vorliegenden Metabolitprofil (Abbildung 8) im WT und in stärkerem Maße in 35S::RAP2.12 Pflanzen nach 16 h hypoxischer Behandlung erkennbar war. So stiegen z.B. die Mengen an Serin, Tyrosin, Methionin und Threonin in den Kontrolllinien unter Hypoxie an (Abbildung 8). Die konstitutive Stabilisierung des Transkriptionsfaktors RAP2.12 in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen hatte zur Folge, dass diese charakteristische Akkumulation von Amino- und organischen Säuren auch bei normalen Sauerstoffkonzentrationen vorlag (z.B. Alanin, Leucin, Methionin, Serin, Threonin, Valin,

Citrat, Laktat, Malat und Pyruvat; Abbildung 8). Das deutet darauf hin, dass die artifiziell erzeugte dauerhafte Aktivität dieses Transkriptionsfaktors die Umstellung des Pflanzenmetabolismus auf Hypoxie bedingte, obwohl die Pflanzen ausreichend Sauerstoff für die Atmung zur Verfügung hatten. Die Perzeption hierfür war jedoch durch die Deletion des sauerstoffsensitiven N-Terminus nicht möglich, RAP2.12 wurde nicht über den NERP abgebaut und löste vermutlich durch eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren und genetischer Regulation („Hit-and-Run Mechanismus“, Schaffner (1988); siehe unten) die Umstellung des Metabolismus auf hypoxische Bedingungen aus. Eine weitere Besonderheit ist dabei, dass die Stabilisierung von RAP2.12 in diesen Pflanzen seit der Keimung vorlag und im Metabolitprofil in Abbildung 8 daher die Auswirkungen auf den Stoffwechsel über die gesamte Wachstumszeit von 5 Wochen dargestellt sind. Da *Arabidopsis thaliana* eine Spezies ist, die eher intolerant gegenüber sauerstoffarmen Bedingungen ist (Fukao und Bailey-Serres, 2004), bezogen sich die Metabolitprofile bisheriger Studien auf relativ kurze Behandlungszeiten von 30 min bis 48 h (Mustroph et al., 2014; van Dongen et al., 2009; Branco-Price et al., 2008). Für tolerantere Pflanzenarten wie Reis (*Oryza sativum*) oder Hornklee (*Lotus japonicus*) betrug die Behandlungsdauer zum Teil mehrere Tage (Shingaki-Wells et al., 2011; Rocha et al., 2010). Die Ansammlung von Amino- und organischen Säuren im Pflanzenmetabolismus wurde dabei jedoch speziesübergreifend festgestellt. Die tendenziell reduzierte Menge an Kohlenhydraten, die in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen vorlag und wahrscheinlich wenigstens teilweise die Folge der konstitutiv aktivierten Gärung (siehe 4.2) war, war in anderen Studien mit relativ kurzer Behandlungsdauer nur teils erkennbar (Narsai et al., 2011). Außerdem waren in der metabolischen Analyse der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie die Mengen an Salicylsäureglucosid, Picolinsäure und Pipecolinsäure deutlich erhöht (Abbildung 8 B und C), welche in Pflanzen wichtige Rollen für die Immunantwort auf Pathogene innehaben (Bernsdorff et al., 2016; Návarová et al., 2012; Zhang et al., 2004). Der Zusammenhang der pflanzlichen Immunantwort mit ERFVII Transkriptionsfaktoren wurde schon mehrfach beobachtet. So kann einerseits Pathogenbefall zur Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren führen (Zhao et al., 2012; Xu et al., 2007), andererseits können die Überexpression und die Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren aber auch die genetische Antwort auf Pathogene aktivieren (Giuntoli et al., 2017; Zhang et al., 2009; Jung et al., 2007), wie es sich auch in der vorliegenden Arbeit abzeichnete. Durch die erhöhte Verletzungs- und Infektionsgefahr während und nach der Überschwemmung pflanzlicher Gewebe (Giuntoli und Perata, 2018; Hsu et al., 2013) erscheint dieser Zusammenhang durchaus sinnvoll. Ein weiteres Beispiel dafür ist die Familie der WRKY Transkriptionsfaktoren, welche bei Überflutung stark exprimiert werden und die immanente Immunantwort aktivieren (Hsu et al., 2013).

Ein Mitglied daraus, WRKY22, führt bei konstitutiver Expression zu einem vergleichbaren transkriptionellen Muster wie die artifizielle Stabilisierung von RAP2.12 (Giuntoli und Perata, 2018). Außerdem bedingt letztere eine erhöhte Genexpression der beiden Vertreter *WRKY40* und *WRKY75* (Giuntoli et al., 2017). Das unterstützt ebenfalls die „Hit-and-Run“ Theorie (Schaffner, 1988) für die Wirkungsweise von RAP2.12, nach der zentrale Transkriptionsfaktoren zunächst die Expression anderer Transkriptionsfaktoren anregen, welche dann in weiteren Schritten die transkriptionelle Regulation, z.B. der Immunantwort, steuern.

#### 4.2 Die Stabilisierung von RAP2.12 reguliert den Gärungsstoffwechsel

Unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen wird die Glykolyse zur ATP Produktion stärker aktiviert, wodurch Pyruvat und NADH akkumulieren (siehe 1.2). Die Anregung der Glykolyse war im Metabolitprofil der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie erkennbar (Abbildung 8 A und B). Dabei war bezüglich der Sequenz des glykolytischen Abbaus von Zuckern zu Pyruvat ein Verlauf von verringerten zu erhöhten Pools zu beobachten. So lagen die Mengen des Kohlenhydratspeichers Stärke und von Glukose reduziert vor, wohingegen Pyruvat deutlich angereichert war. Letzteres wird bei Hypoxie enzymatisch umgesetzt, entweder durch AlaAT zu Alanin oder in der Gärung unter NAD<sup>+</sup> Regeneration durch PDC und ADH zu Ethanol bzw. durch LDH zu Laktat. Außerdem entsteht über den „GABA shunt“ GABA (siehe 1.2). Für die genannten Enzyme waren bei artifizieller RAP2.12 Stabilisierung sowohl die Transkriptlevel (Abbildung 5 A und C) als auch die maximalen Aktivitäten (Abbildung 6), welche direkt mit der Enzymmenge korrelieren, unter normalen Sauerstoffbedingungen gegenüber den Kontrolllinien stark erhöht. Außerdem akkumulierten die entsprechenden Produkte Ethanol, Laktat und Alanin (Abbildung 7 und Abbildung 8 B). Der konstitutiv aktive Transkriptionsfaktor RAP2.12 führte in diesen Pflanzen also zu aerober Gärung und, als Folge der verstärkten Glykolyseaktivität, zur Dezimierung der zellinternen Kohlenstoffreserven. Das betont die Bedeutung des hochdynamischen Systems, durch das die Aktivität von RAP2.12 normalerweise gesteuert wird. Der NERP-abhängige Abbau sowie das enge Zusammenspiel des Transkriptionsfaktors mit seinen Antagonisten (Abbildung 3) soll garantieren, dass unter Normoxie die Vergeudung von Kohlenstoffreserven in der Gärung verhindert wird (Loreti et al., 2016).

Die Genexpression für die Fermentationsenzyme und andere hypoxische Markergene war in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen unter Hypoxie meist nicht höher als unter Normoxie (Abbildung 5). Das ist verwunderlich, da unter den verringerten Sauerstoffbedingungen auch die anderen ERFVII Transkriptionsfaktoren im Zellkern stabilisiert werden und sie durch ihre Aktivität die hypoxische Genexpression in diesen Pflanzen weiter verstärken

sollten. Allerdings ist anzunehmen, dass durch die konstitutive Stabilisierung von RAP2.12 die Maschinerie der Antagonisten ebenfalls konstitutiv aktiv vorlag (Abbildung 3). Deshalb wurde wahrscheinlich in den  $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Überexpressoren einer Amplifizierung der hypoxischen Genexpression durch andere ERFVII Transkriptionsfaktoren schon bei einsetzender Hypoxie entgegengewirkt. In 35S::RAP2.12 Pflanzen, in welchen der sauerstoffsensitive Transkriptionsfaktor bei Normoxie über den NERP abgebaut wurde, konnten dagegen unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen erst alle initialen Transkriptionsfaktoren aktiv werden, bevor die Reaktion durch Antagonisten abgeschwächt wurde. So konnten in diesen Pflanzen innerhalb der hypoxischen Behandlungszeit von 16 h vergleichbar hohe Expressionslevel hypoxischer Markergene erreicht werden wie in den 35S:: $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen unter gleichen Bedingungen (Abbildung 5 B und D).

Obwohl sich die Genexpression für die Fermentationsenzyme in 35S:: $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen unter Hypoxie meist nicht weiter erhöhte (Abbildung 5), stieg die maximale Aktivität dieser Enzyme unter sauerstoffarmen Bedingungen trotz des hohen normoxischen Ausgangswerts weiter an (Abbildung 6). Das führte im Vergleich zu den Kontrolllinien zu einer deutlich gesteigerten Akkumulation von Ethanol, Laktat und Alanin in diesen Pflanzen (Abbildung 7 und Abbildung 8 B). Interessanterweise war hierbei ein multiplikativer Effekt zu verzeichnen, denn die Enzymmengen der 35S:: $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen für ADH, PDC, LDH und AlaAT waren unter Hypoxie etwa ein Viertel bis ein Drittel erhöht gegenüber Normoxie (Abbildung 6), wohingegen sich die Produktmenge verdoppelte (Alanin, Abbildung 8 B) bis vervierfachte (Ethanol und Laktat, Abbildung 7 und Abbildung 8 B). Die katalytische Aktivität der Enzyme scheint in den  $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Überexpressoren also unter sauerstoffarmen Bedingungen gestiegen zu sein, was z.B. an der höheren Menge des Edukts Pyruvat (Abbildung 8 B), an post-translationalen Modifikationen der Enzyme selbst oder an weiteren Faktoren liegen könnte. So wird z.B. der cytosolische pH-Wert durch die Laktatgärung angesäuert, wodurch er sich an das katalytische Optimum von PDC annähert, was vermutlich die Umstellung auf die favorisierte (siehe 1.2) alkoholische Gärung fördert (Bailey-Serres und Voeselek, 2008).

Wie in 3.1.3 bereits erwähnt, stieg in den Kontrolllinien unter Hypoxie die Menge an Alanin an, nicht aber an GABA (Abbildung 8 B und C), wohingegen in 35S:: $\Delta 13\text{RAP2.12}$  Pflanzen für beide Metabolite eine erhöhte Konzentration zu verzeichnen war. Tatsächlich ist aber in *Arabidopsis* Rosetten, welche hier verwendet wurden, unter Hypoxie nur eine erhöhte Alaninmenge zu erwarten, während GABA hauptsächlich in den Wurzeln akkumuliert (Mustroph et al., 2014), die wesentlich häufiger mit verringerten Sauerstoffkonzentrationen frequentiert werden. Die konstitutive Aktivierung von RAP2.12 führte jedoch auch in den Rosetten zu hohen Mengen an GABA (Abbildung 8 C).

### 4.3 Die Stabilisierung von RAP2.12 beeinflusst die Zellatmung und den Energiehaushalt

Pflanzenzellen sind in der Lage, unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen die Zellatmung proaktiv zu inhibieren, um einer völligen Anoxie vorzubeugen (Zabalza et al., 2009; Geigenberger et al., 2000). Dies passiert schon deutlich bevor der  $K_m$ -Wert der Cytochrom-c Oxidase für Sauerstoff erreicht ist, was auf ein aktives System zur Sauerstoffperzeption schließen lässt (Zabalza et al., 2009). Tatsächlich führte die artifizielle Stabilisierung des Transkriptionsfaktors RAP2.12 zur Verringerung der Atmungsrate unter Normoxie (Abbildung 9). Das bedeutet, dass die Zellatmung in diesen Pflanzen reduziert vorlag, obwohl genügend Sauerstoff zur Verfügung stand, und lässt darauf schließen, dass RAP2.12 einen wichtigen Bestandteil des pflanzlichen Systems zur Sauerstoffperzeption darstellt.

Die Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette und folglich auch der Zellatmung ist über das Enzym SDH (Komplex II) direkt an den Citratzyklus gekoppelt, welches unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen gehemmt wird und zur Gabelung des Citratzyklus führt (António et al., 2016; Rocha et al., 2010; Vanlerberghe et al., 1989) (siehe 1.2). Im Metabolitprofil der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen war das Verhältnis von Succinat zu Fumarat zwar erhöht (Abbildung 8 C), jedoch konnte weder eine verringerte *SDH1* Transkriptmenge noch eine gehemmte SDH Enzymaktivität im Vergleich zu WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen festgestellt werden (Abbildung 11 A und B). Die Messung letzterer war jedoch nur in isolierten Mitochondrien möglich. Das heißt, dass während dieser mehrstündigen Prozedur der restliche zelluläre Kontext entfernt wurde, wodurch eventuell eine RAP2.12-initiierte Hemmung der SDH aufgehoben wurde. Außerdem mussten die Pflanzen zur Mitochondrien-Isolation in Halbflüssigkulturen angezogen werden, daher lag wahrscheinlich in den Kontrolllinien flüssigkeitsbedingt ebenfalls eine Reaktion auf verringerte Sauerstoffkonzentrationen vor, wie z.B. die Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren. Somit könnte die SDH Aktivität bei dieser Messung auch in den Kontrolllinien verringert gewesen sein, wodurch kein Unterschied zu den 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen festgestellt werden konnte. Die GC-MS Daten aus Erdkulturen (Abbildung 8) erscheinen daher verlässlicher.

Im Citratzyklus der  $\Delta$ 13RAP2.12 Überexpressoren war unter Normoxie die Menge an Citrat signifikant erhöht gegenüber den Kontrolllinien (Abbildung 8 B und C), was unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen die Induktion der AOX zur Folge haben kann (Gupta et al., 2012). Leichte Tendenzen hierfür waren in der *AOX1a* Transkriptmenge und in der *AOX1/2* Proteinmenge unter Stabilisierung von RAP2.12 zu erkennen, allerdings waren die Unterschiede zu den Kontrolllinien nicht signifikant (Abbildung 11 C - E). Das spricht dafür, dass unter Hypoxie vermutlich weitere Faktoren bei der Induktion der AOX

eine Rolle spielen, welche z.B. vom Redoxstatus der Mitochondrien abhängen könnten (Del-Saz et al., 2018; Selinski et al., 2018; Gelhaye et al., 2004).

Insgesamt ist die Rolle der Mitochondrien unter Hypoxie bzw. die Kommunikation dabei zwischen Mitochondrien und anderen Kompartimenten, wie dem Zellkern, vermutlich sehr komplex. Zweifelsohne ist das Mitochondrium als Ort der Atmungskette ein Kompartiment, in dem sich verringerte Sauerstoffkonzentrationen schnell auswirken. In der Folge gehen von den Mitochondrien Signale aus, die charakteristisch für sauerstoffarme Bedingungen sind, wie z.B. die Ausschüttung von Calcium-Ionen (Subbaiah et al., 1998) oder die Produktion von ROS (Rhoads et al., 2006; Fukao und Bailey-Serres, 2004). Außerdem führt schon eine leichte Verringerung der Sauerstoffkonzentration zu einem Abfall des ATP/ADP Verhältnisses (Geigenberger, 2003; Geigenberger et al., 2000), was ebenfalls ein wichtiges Signal für die Zelle darstellt, z.B. wird daraufhin die alkoholische Gärung angeregt (Zabalza et al., 2009). Unter RAP2.12 Stabilisierung wurde sowohl das verringerte Verhältnis von ATP/ADP (Abbildung 10 C), vermutlich als Folge der verringerten Atmungsrate (Abbildung 9), als auch die Induktion der alkoholischen Gärung vorgefunden (siehe 4.2). Letztere könnte zusätzlich durch die Aktivität von SnRK1 (Sucrose nonfermenting Related Kinase 1) angeregt worden sein (Im et al., 2014; Cho et al., 2012), einem Energiesensor, der unter anderem bei verringerten Sauerstoffkonzentrationen eine wichtige Rolle spielt (Lee et al., 2014; Park et al., 2010), da er bei Energiemangel ATP-verbrauchende Stoffwechselwege inhibiert (Hardie et al., 2012).

#### **4.4 Die Stabilisierung von RAP2.12 beeinflusst die Photosynthese**

Die artifizielle Stabilisierung von RAP2.12 in *Arabidopsis* führte zu aerober Gärung und in der Folge zu verringerten Stärkegehalten im Vergleich zu den Kontrolllinien (siehe 4.2). Unter konstanter Belichtung, bei der das Wachstum der Pflanzen nicht von Stärke abhängt, sollte der Phänotyp der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen also kompensiert werden (siehe 3.3.2). Stattdessen zeigte sich jedoch, dass die negativen Auswirkungen der RAP2.12 Deregulation auf Pflanzenwachstum, Frischgewicht und die Gehalte an Stärke, Glukose und Fruktose mit zunehmender Tageslänge stärker wurden (Abbildung 13 und Abbildung 14), da die photosynthetische Aktivität und damit auch der Aufbau von Zuckern in diesen Pflanzen verringert gegenüber den Kontrolllinien vorlag (Abbildung 15 und Abbildung 16). Über die Wachstumszeit von 5 Wochen führte die konstante Belichtung der Pflanzen also dazu, dass die Wachstumsunterschiede zwischen den Genotypen stärker wurden, anstatt zu verschwinden (Abbildung 13 E und F).

Eine Verringerung der Photosyntheserate bei Hypoxie wurde in Pflanzen schon mehrfach gezeigt (Liu et al., 2014; Chen et al., 2005; Sand-Jensen und Frost-Christensen, 1999).

## DISKUSSION

Dies wurde häufig mit einer reduzierten Verfügbarkeit von Licht (siehe unten) und einer, durch die Schließung der Stomata bei Hypoxie oder Überschwemmung verursachten, verringerten CO<sub>2</sub> Konzentration in den Pflanzen (Herrera, 2013; Else et al., 2009) in Verbindung gebracht. Die Umstellung des Pflanzenmetabolismus auf Hypoxie in 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen wirkte sich jedoch negativ auf die Photosynthese aus, obwohl weder die Verfügbarkeit von Licht noch die von CO<sub>2</sub> limitiert war. Im Gegenteil, aufgrund der verringerten CO<sub>2</sub> Fixierung (Abbildung 15) war die Konzentration an interzellulärem CO<sub>2</sub> in diesen Pflanzen sogar höher als in den Kontrolllinien (Anhang Abbildung 4). Das bedeutet, dass in den Δ13RAP2.12 Überexpressoren vermutlich ein zellinterner Faktor eine Verringerung der Photosynthese nach sich zog. Allerdings konnte die verringerte Photosyntheserate nicht dadurch erklärt werden, dass die Menge eines der überprüften Proteine, die im Zusammenhang mit der Photosynthese stehen, reduziert vorlag (Abbildung 17). Stattdessen könnte die photosynthetische Aktivität in 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen aber dadurch verringert worden sein, dass bei hypoxischer Genregulation unter anderem die Gene für Galactolipid- und Sulfolipid-Biosyntheseenzyme induziert werden, was zu einer veränderten Zusammensetzung der Chloroplastenmembranen und in der Folge zu einer reduzierten Photosyntheserate führen kann (van Dongen und Licausi, 2015; Klecker et al., 2014). Des Weiteren könnte die Akkumulation von Salicylsäure unter konstitutiver RAP2.12 Stabilisierung (Abbildung 8 B) ebenfalls dazu geführt haben, dass die Photosynthese in diesen Pflanzen herunterreguliert wurde (Bernsdorff et al., 2016).

Außerdem ist bekannt, dass sich Stress negativ auf die Photosynthese auswirken kann, was sich in verringerten photochemischen Quantenausbeuten, wie sie in den 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen messbar waren (Abbildung 16), äußert (Baker, 2008; Baker und Rosenqvist, 2004; Maxwell und Johnson, 2000). Dies gilt auch für oxidativen Stress, durch den schon der erste Messwert dunkeladaptierter Pflanzen zur Bestimmung der maximalen Quantenausbeute Fv/Fm verringert vorliegen kann (Zwack et al., 2016; Xia et al., 2009; Iannelli et al., 1999). Die im Vergleich zu WT und 35S::RAP2.12 Pflanzen erhöhte Transkriptmenge der Markergene für oxidativen Stress *HR4* und *GSTU24* (Abbildung 20) sowie die gesteigerte Menge an oxidiertem Glutathion (Abbildung 19) in jungen Blättern der 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen deuteten auf oxidativen Stress in diesen Geweben hin (siehe 4.6). Gleichzeitig zeigte die Messung der PSII Quantenausbeuten unter getrennter Betrachtung verschiedener Blattalter, dass die im Vergleich zu den Kontrolllinien verringerte Photosyntheserate der 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen hauptsächlich von den jüngeren Blättern herrührte (Abbildung 21). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die reduzierten Fv/Fm Werte der mittleren und jungen Blättern in diesen Pflanzen (Abbildung 21 C und E) durch oxidativen Stress verursacht wurden. Auch die effektiven Quantenausbeuten, deren Kurven für die jüngeren Gewebe von

35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen einen flacheren Verlauf zeigten als die der Kontrolllinien (Abbildung 21 D und F), könnten durch oxidativen Stress verringert worden sein, da dieser die Reparatur des PSII nach Lichtschädigung beeinträchtigt (Nishiyama et al., 2001). Letzteres könnte auch erklären, warum unter Stabilisierung von RAP2.12 die Photosynthese bei höheren Lichtbedingungen, bei welchen ein höheres Maß an Lichtschädigung auftritt, deutlich stärker gehemmt wurde als in den Kontrolllinien (Abbildung 15).

Obwohl Studien zeigten, dass Pflanzen, die während einer Überschwemmung belichtet wurden, aufgrund der Kohlenhydrat- und Sauerstoff-Produktion durch die Photosynthese bessere Überlebenschancen aufwiesen (Vashisht et al., 2011; Mommer und Visser, 2005), sind Lichtqualität und -quantität unter diesen Bedingungen meist stark eingeschränkt (van Dongen und Licausi, 2015; Pierik et al., 2011). Hohe Lichtintensitäten bei gleichzeitiger Hypoxie der Blätter durch Überschwemmung kommen in der Natur also vermutlich eher selten vor (Mommer und Visser, 2005). Viel häufiger werden Pflanzen von trübem Wasser überschwemmt (Loreti et al., 2016). In der Folge sind die genetischen Antworten auf Hypoxie und auf Dunkelheit oft eng verwandt, z.B. wird der ERFVII Transkriptionsfaktor RAP2.2, der die hypoxische Genregulation von RAP2.12 redundant aktiviert (Gasch et al., 2016; Bui et al., 2015) (siehe 1.3.2), auch stark durch Dunkelheit induziert (Hinz et al., 2010).

#### **4.5 Die verringerten Kohlenhydratreserven unter RAP2.12 Stabilisierung beeinflussen Pflanzenwachstum und post-anoxisches Überleben**

In 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen wurden aufgrund verringerter Photosyntheseraten weniger Kohlenhydrate aufgebaut als in den Kontrolllinien (siehe 4.4) und gleichzeitig durch aerobe Gärung mehr Kohlenhydrate verbraucht (siehe 4.2), was zu einer verringerten Menge verschiedener Zucker wie Glukose (Abbildung 14 B), Maltose oder Ribose (Abbildung 8 A) und zu einer deutlich reduzierten Menge an Stärke (Abbildung 8 A und Abbildung 14 A) führte. Höchstwahrscheinlich wirkte sich dieser Mangel an Kohlenhydraten negativ auf das Wachstum der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen aus (Abbildung 13 und Abbildung 18 A). Unter sauerstoffarmen Bedingungen beeinflussen die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten, speziell des Kohlenhydratspeichers Stärke, sowie deren kontrollierter Abbau aber auch maßgeblich das Überleben von Pflanzen (Loreti et al., 2018; Muroph et al., 2014; Fukao et al., 2006; Fukao und Bailey-Serres, 2004). Entsprechend war die Überlebensrate von 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen ohne Zugabe von zusätzlichen Kohlenhydraten nach anoxischer Behandlung stark verringert gegenüber denen der Kontrolllinien (Abbildung 12 A), was mit den verringerten prä-anoxischen Stärkegehalten unter konstitutiver RAP2.12 Stabilisierung zusammenhing (Abbildung

12 B). Mit zusätzlicher Saccharose im Medium konnten 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen mehr Stärke einlagern und in der Folge stieg ihre post-anoxische Überlebensrate auf WT-Niveau an (Abbildung 12). Schon Sasidharan und Mustruph (2011) sowie Bailey-Serres et al. (2012) postulierten, dass die gegensätzlichen Ergebnisse von Gibbs et al. (2011) und Licausi et al. (2011b) bezüglich der Überlebensrate von NERP Mutanten nach hypoxischer Behandlung (siehe 1.5.1 und 3.3) höchstwahrscheinlich durch die Verfügbarkeit bzw. Abwesenheit von Kohlenhydraten im Medium zustande gekommen sein könnten. Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit jetzt also experimentell bestätigt werden.

Die Reoxygenierung ist ein weiterer wichtiger Faktor, der die post-anoxischen Überlebensraten der Genotypen in Abbildung 12 A maßgeblich beeinflusst haben könnte, aber in der Literatur nicht so gut charakterisiert ist wie die Reaktionen auf verringerte Sauerstoffkonzentrationen selbst (Shingaki-Wells et al., 2014). Diese Phase, in der Sauerstoff ins Gewebe zurückkehrt, ist mit der Entstehung hoher Konzentrationen an ROS verbunden und stellt somit eine zweite, oxidative Stresssituation im Anschluss an die sauerstoffarmen Bedingungen dar (Blokchina et al., 2003). Sie ist gekoppelt mit einer erneuten Umstellung der Transkription (Narsai et al., 2009), der Aufhebung der translationalen Repression vieler mRNAs (Branco-Price et al., 2008) (siehe 1.3.1) und der Wiederaufnahme des Citratzyklus (Narsai et al., 2009), welcher durch den Abbau von Alanin (de Sousa und Sodek, 2003) und Ethanol (Tsuji et al., 2003) mit Acetyl-CoA gespeist wird. Außerdem steigen die Gehalte an Fruktose und Glukose wieder (Narsai et al., 2009). Die Abschaltung der hypoxischen Genexpression und des daraus resultierenden energetisch ungünstigen Metabolismus (siehe 1.2 und 4.1 - 4.3) ist somit unter Reoxygenierung von höchster Wichtigkeit und wird durch die sauerstoffabhängige NERP Degradation sichergestellt (siehe 1.3.2). Unter konstitutiver Stabilisierung von RAP2.12 war das jedoch nicht möglich, wodurch die Pflanzen vermutlich auch bei der Reoxygenierung weiter Kohlenhydrate durch Gärung energetisch ungünstig umgesetzt. Dies wirkte sich ohne Saccharose im Medium negativ auf die Überlebensrate aus, konnte durch Zugabe des Zuckers jedoch kompensiert werden (Abbildung 12 A).

#### 4.6 Die Stabilisierung von RAP2.12 wirkt sich stark auf die Pflanzenentwicklung aus

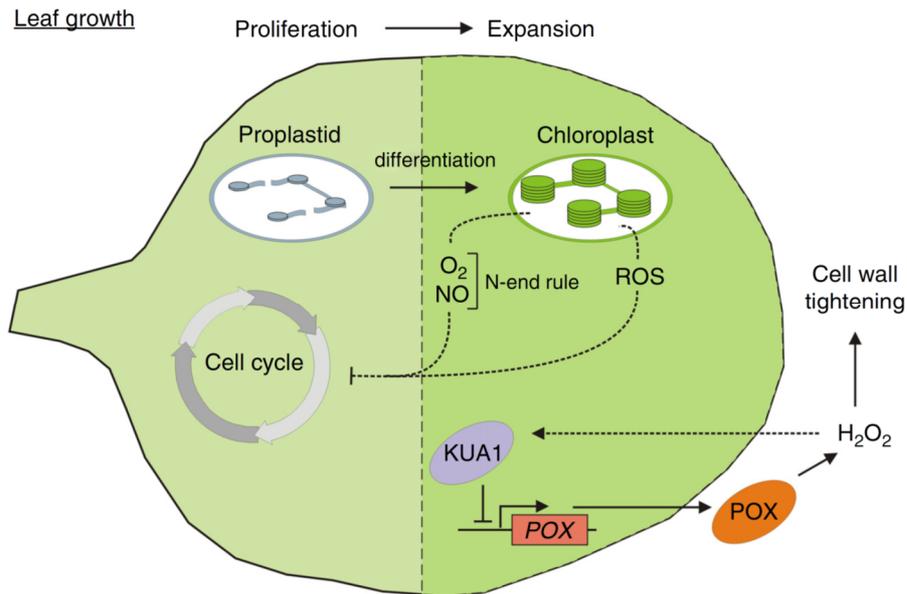
Giuntoli et al. (2017) konnten zeigen, dass die Aktivität der ERFVII Transkriptionsfaktoren in Keimlingen sehr hoch ist, jedoch in adulten Pflanzen durch einen bislang ungeklärten Mechanismus stark abnimmt. In der vorliegenden Arbeit war die Aktivität des Transkriptionsfaktors in 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen jedoch konstitutiv gegeben, was sich folglich vor allem in jüngeren Blättern adulter Pflanzen auswirkte, in denen RAP2.12 nicht mehr so aktiv sein sollte. So zeigten die jüngeren Blätter der Pflanzen einen blassen Phänotyp und eine gestörte Blattentwicklung (Abbildung 18 A), einen verringerten Chlorophyllgehalt (Abbildung 18 B), eine höhere Menge an oxidiertem Glutathion (Abbildung 19), eine höhere Expression von Markergenen für oxidativen Stress (Abbildung 20) und verringerte photochemische PSII Quantenausbeuten (Abbildung 21) gegenüber Blättern der Kontrolllinien im gleichen Alter.

Die Stabilisierung von ERFVII Transkriptionsfaktoren unterdrückt die Biosynthese von Chlorophyll (siehe 1.4), was jedoch durch Licht teilweise aufgehoben werden kann (Abbas et al., 2015). Die Kombination aus beidem bedingte wahrscheinlich den verringerten Chlorophyllgehalt in mittleren und jungen Blättern der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen (Abbildung 18). Die Chlorophyllbiosynthese ist jedoch ein wichtiges retrogrades Signal, das mit der Differenzierung der Proplastiden zu Chloroplasten einhergeht und somit den Übergang der Blattzellen von der Proliferations- in die Expansionsphase beeinflusst (Andriankaja et al., 2012) (Abbildung 22). Dieser Übergang könnte unter konstitutiver RAP2.12 Stabilisierung eingeschränkt sein, was die kleineren (Abbildung 18 A) und dickeren (Giuntoli et al., 2017) Blätter der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen zur Folge haben könnte. Die im Vergleich zu den Kontrolllinien erhöhte Menge an *RBR* Transkript in diesen Pflanzen, welche in mittleren und jungen Blättern gemessen wurde (Abbildung 20 B und C), könnte entweder durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase hervorgerufen worden sein, falls RBR unphosphoryliert vorlag (Harashima und Sugimoto, 2016), oder ebenfalls für eine verlängerte Phase der Zellproliferation sprechen, da RBR im phosphorylierten Zustand den Erhalt der Zellproliferation fördert und die Zelldifferenzierung reprimiert (Horvath et al., 2017). So kommen hohe Mengen an phosphoryliertem RBR neben Meristemen vor allem in jungen Blättern vor (Horvath et al., 2017; Magyar et al., 2012). Die Genexpression von *RBR* wird durch TCP Transkriptionsfaktoren gesteuert, die über Glutathion reguliert werden (Viola et al., 2013; Li et al., 2012) und eine Schlüsselrolle in der Pflanzenentwicklung innehaben, da einige TCP Transkriptionsfaktoren in sich entwickelnden Geweben die Zellproliferation aufrechterhalten (Nicolas und Cubas, 2016; Martín-Trillo und Cubas, 2010). Interessanterweise werden TCP Transkriptionsfaktoren durch DELLA Proteine gebunden und dadurch inaktiviert (Resentini et al., 2015; Davière

et al., 2014), ähnlich wie RAP2.12 (Marín-de la Rosa et al., 2014). Das für die Pflanzenentwicklung wichtige Phytohormon Gibberellinsäure reguliert wiederum die Stabilität der DELLA Proteine (siehe 1.3.3). Außerdem kristallisiert sich in der Literatur immer deutlicher heraus, dass ERFVII Transkriptionsfaktoren mit Gibberellinsäure-Signalwegen interagieren (Gibbs et al., 2015). Die Pflanzenentwicklung könnte also maßgeblich durch ein komplexes Netzwerk aus Gibberellinsäure, DELLA Proteinen, TCP sowie ERFVII Transkriptionsfaktoren gesteuert und so den jeweiligen Wachstumsbedingungen angepasst werden.

Dass dabei auch der NERP ein zentrales Element darstellt, kristallisierte sich in den letzten Jahren zunehmend heraus. So zeigten NERP KO-Mutanten Veränderungen über ihren gesamten Lebenszyklus, angefangen bei reduzierten Keimungsraten über veränderte Blattformen, Verlust der Apikaldominanz und verringerter Stängelelongation bis hin zu verzögerter Blattseneszenz (Gibbs et al., 2014; Graciet und Wellmer, 2010; Graciet et al., 2009). Doch auch eine erhöhte NERP Aktivität durch PCO-Überexpression führte zu verringerten Blattgrößen und in der Folge zu reduzierten Frischgewichten der Pflanzen (Weits et al., 2014). Aufbauend auf diesen Befunden stellten Schippers et al. (2016) ein theoretisches Modell zur Rolle des NERP in der Blattentwicklung auf, wonach die Regulation des Zellzyklus und damit der Übergang von der Zellproliferation zur -expansion mit der Aktivität des NERP gekoppelt sein könnte (Abbildung 22). Bei Überexpression der NERP-insensitiven Form von RAP2.12 in der vorliegenden Arbeit unterlag der Transkriptionsfaktor nicht mehr dieser Kontrolle und in der Folge deuteten mehrere Faktoren, wie die veränderte Blattmorphologie, geringere Chlorophyllmengen und erhöhte *RBR* Transkriptlevel (siehe oben) auf eine verlängerte Phase der Zellproliferation in jüngeren Geweben der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu den Kontrolllinien hin. Dieser Befund würde die Theorie zur Rolle des NERP in der Blattentwicklung (Abbildung 22) von Schippers et al. (2016) also stützen. Allerdings ist noch weitestgehend unklar, ob und wie ERFVII Transkriptionsfaktoren und der NERP die Regulation des Zellzyklus beeinflussen. Eine Möglichkeit, die sich in der vorliegenden Arbeit abzeichnete, wäre die Steuerung des Zellzyklus über Glutathion (Díaz-Vivancos et al., 2010; Pellny et al., 2009). So war die Menge an oxidiertem Glutathion in jungen Blättern der 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen im Vergleich zu WT Pflanzen erhöht (Abbildung 19), was den Zellzyklus beeinflusst haben könnte. Die genauen Zusammenhänge müssten aber durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden.

## DISKUSSION



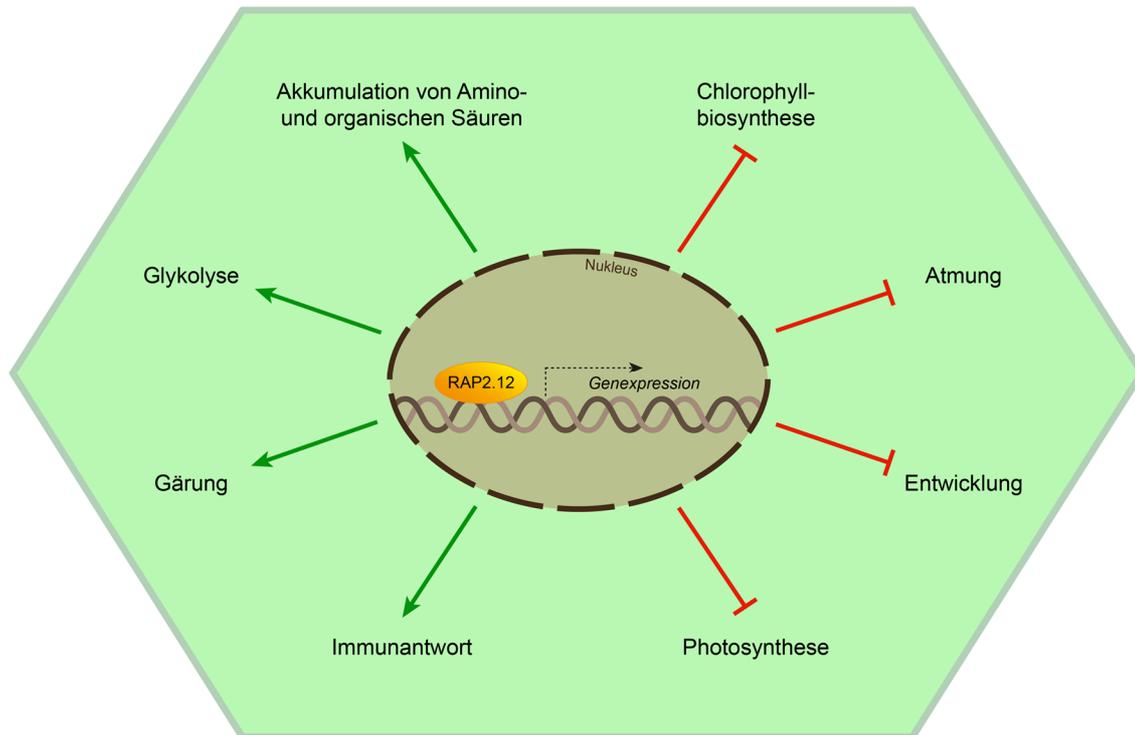
**Abbildung 22:** Modell zur Rolle des NERP in der Blattentwicklung. Bei der Blattentwicklung findet der Übergang von der Zellproliferation zur -expansion mit der Differenzierung der Proplastiden zu Chloroplasten statt (Andriankaja et al., 2012). Durch die Photosynthese werden daraufhin ROS und Sauerstoff erzeugt, was den NERP aktivieren könnte und Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus nehmen könnte (Schippers et al., 2016). Bei der Zellexpansion müssen zunächst die Bindungen zur Zellwand gelöst werden, welche unter Aktivität der Peroxidasen (POX) durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet werden. Dazu wird der Transkriptionsfaktor KUODA1 (KUA1) hochreguliert, der die Expression der *POX* Gene inhibiert, wodurch die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermindert und somit die Zellexpansion ermöglicht wird (Lu et al., 2014). Abbildung übernommen aus Schippers et al. (2016).

Die konstitutive Stabilisierung des Transkriptionsfaktors RAP2.12 induziert die Expression der Markergene für oxidativen Stress *HR4* und *GSTU24* (Giuntoli et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass dies in adulten Pflanzen nur für die mittleren und jungen Blätter zutrifft (Abbildung 20). Da in jungen Blättern der *35S::Δ13RAP2.12* Pflanzen gleichzeitig die Menge an oxidiertem Glutathion signifikant gegenüber der in WT Pflanzen erhöht war (Abbildung 19), scheint in diesen Blättern tatsächlich oxidativer Stress geherrscht zu haben, dem das Antioxidans Glutathion entgegenwirkte. Dieser könnte durch die ROS Produktion unter Interaktion von HRU1 und RBOHD, welche durch die Aktivität von RAP2.12 reguliert wird (siehe 1.3.3), in diesem Gewebe entstanden sein. ROS könnten aber auch dadurch gebildet worden sein, dass Lichtenergie in verringertem Maße photochemisch genutzt werden konnte und teils nicht-reguliert nicht-photochemisch gelöscht wurde (Anhang Abbildung 6). Während bei regulierter Löschung hauptsächlich Wärme entsteht, zieht die nicht-regulierte Löschung meist Schädigungen des Gewebes, z.B. aufgrund entstehender ROS, nach sich (Klughammer und Schreiber, 2008).

#### 4.7 Fazit und Ausblick

Der ERFVII Transkriptionsfaktor RAP2.12, einer der initialen Transkriptionsfaktoren zur Regulation der hypoxischen Genexpression, wird in *Arabidopsis thaliana* nur unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen stabilisiert und damit aktiviert, da er bei Normoxie über den NERP dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Licausi et al., 2011b; Gibbs et al., 2011). Bisherige Studien belegten mehrfach, dass durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors die zentrale Genantwort auf Hypoxie induziert wird (Bui et al., 2015; Kosmacz et al., 2015; Giuntoli et al., 2014; Licausi et al., 2011b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies auch auf die Stoffwechselebene übertragen wird, da die konstitutive Stabilisierung von RAP2.12 sogar unter aeroben Bedingungen die Umstellung des Pflanzenmetabolismus auf verringerte Sauerstoffkonzentrationen nach sich zog. Das hatte weitreichende Folgen für wichtige zelluläre Prozesse in den Pflanzen (Abbildung 23). So führte die RAP2.12 Stabilisierung bei Normoxie zur Akkumulation einer Vielzahl von Amino- und organischen Säuren, zur Aktivierung der Glykolyse und zu aerober Gärung. Gleichzeitig wurde die Atmung trotz ausreichender Sauerstoffversorgung proaktiv gehemmt und die Immunantwort der Pflanzen aktiviert, obwohl wahrscheinlich kein Pathogenbefall vorlag. Überraschenderweise wirkte sich die konstitutive RAP2.12 Stabilisierung sogar auf die Photosynthese negativ aus. Dadurch wurden weniger Kohlenhydrate aufgebaut und diese zum Teil durch die Gärung schnell und energetisch ungünstig wieder abgebaut. Der resultierende Kohlenhydratmangel hatte vermutlich negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum und bedingte eine verringerte Überlebensrate sauerstoffarmer Bedingungen. In der vorliegenden Arbeit konnte also bewiesen werden, dass die sauerstoffabhängige Regulation des Transkriptionsfaktors RAP2.12 in *Arabidopsis thaliana* unerlässlich für die Funktionalität des Stoffwechsels unter Normoxie und Hypoxie ist. Dies gilt vor allem für die Anpassung der Photosynthese sowie des Gärungs- und Atmungsstoffwechsels und damit für die Optimierung des Kohlenhydrat- und Energiehaushalts unter den jeweiligen Bedingungen. Dadurch ist die dynamische Regulation von RAP2.12 von enormer Wichtigkeit, um das Wachstum der Pflanzen sowie ihre Stressresistenz zu optimieren. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Regulation von RAP2.12 auch für die pflanzliche Entwicklung unentbehrlich ist, da die konstitutive Stabilisierung des Transkriptionsfaktors in jungen Geweben adulter Pflanzen eine veränderte Blattmorphologie, einen verringerten Chlorophyllgehalt und vermutlich sogar eine verlängerte Phase der Zellproliferation nach sich zog.

## DISKUSSION



**Abbildung 23:** Auswirkungen der RAP2.12-abhängigen Genexpression auf wichtige zelluläre Prozesse in *Arabidopsis thaliana*, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten. RAP2.12 löst als zentraler Transkriptionsfaktor für Hypoxie, vermutlich über die Expression und Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren, eine Kaskade transkriptioneller Regulation aus, die in der Zelle weitreichende Folgen hat. So wird der gesamte Metabolismus auf verringerte Sauerstoffkonzentrationen umgestellt, was eine Anregung der Glykolyse und der Gärung sowie eine Anreicherung von Amino- und organischen Säuren bedingt. Außerdem wird die Immunantwort aktiviert, da hypoxische Bedingungen in Pflanzen oft mit einer Überschwemmung zusammenhängen und während sowie nach dieser die Gefahr für Verletzung und Infektion des Pflanzengewebes steigt (Giuntoli und Perata, 2018; Hsu et al., 2013). Des Weiteren wird die Atmung proaktiv gehemmt, um anoxischen Bedingungen in der Zelle vorzubeugen (Zabalza et al., 2009; Geigenberger et al., 2000), und die Chlorophyllbiosynthese sowie die Photosynthese herunterreguliert. Mit zunehmendem Alter der Pflanzen hemmt die Stabilisierung von RAP2.12 zudem wahrscheinlich den Übergang von Zellproliferation zu -expansion, was sich stark auf die Blattentwicklung auswirkt.

In zukünftigen Experimenten wäre die elektronenmikroskopische Untersuchung der Morphologie von Mitochondrien und Chloroplasten unter Stabilisierung von RAP2.12 interessant. Hypoxie-intolerante Pflanzenarten wie *Arabidopsis thaliana* können die Gestalt und damit die Funktion der Mitochondrien unter sauerstoffarmen Bedingungen nicht aufrechterhalten (Shingaki-Wells et al., 2014). Inwiefern die genetische Regulation durch RAP2.12 dabei eine Rolle spielt und ob allein die hypoxische Umstellung des Metabolismus durch RAP2.12 Stabilisierung zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie führt, ist jedoch unklar. Die Verringerung der Atmungsrate, die unter RAP2.12 Stabilisierung beobachtet und nicht durch die Inhibierung der SDH erklärt werden konnte, könnte somit an einer verringerten Funktionalität der Mitochondrien

## DISKUSSION

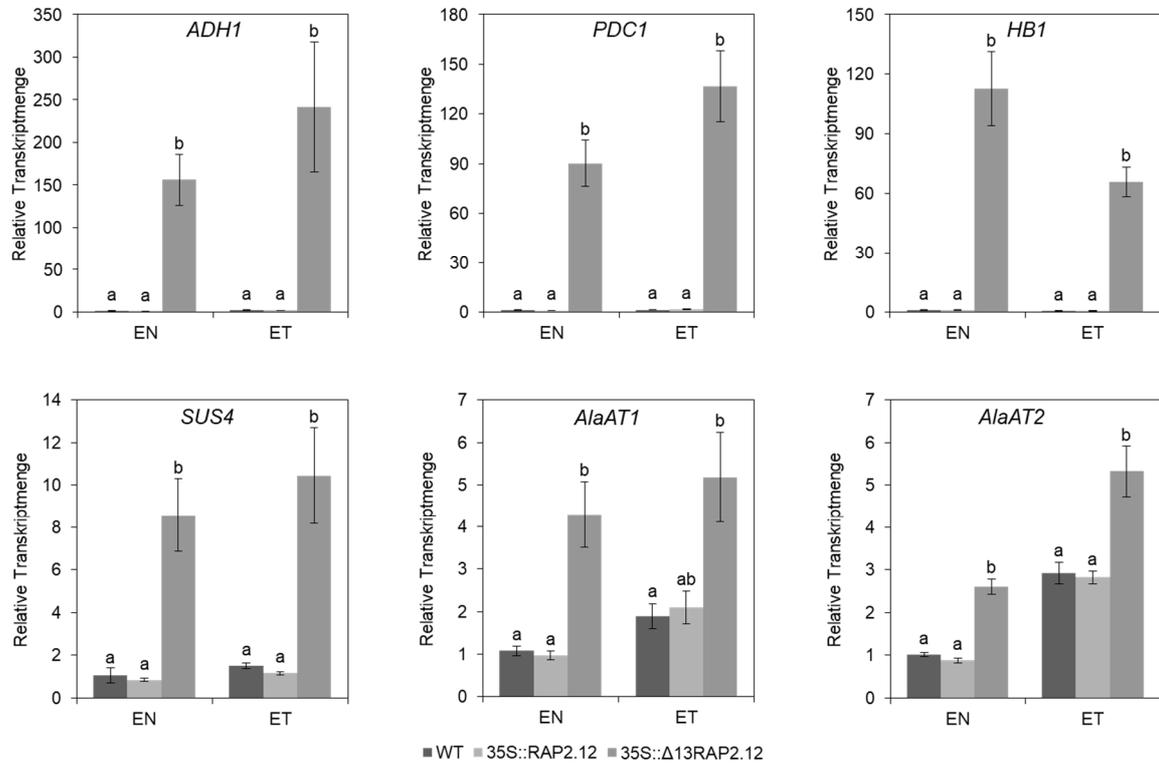
gelegen haben. Ebenso könnte die reduzierte Photosyntheserate durch eine schlechtere Ausdifferenzierung oder veränderte Morphologie der Chloroplasten unter RAP2.12 Stabilisierung bedingt worden sein, weshalb auch deren elektronenmikroskopische Untersuchung interessant wäre.

Außerdem könnte durch gezielte Komplementierung der Quintupel-KO Mutante *erfVII* (Abbas et al., 2015; Marín-de la Rosa et al., 2014), in der die Expression aller fünf ERFVII Transkriptionsfaktoren ausgeschaltet ist, mit einzelnen oder verschiedenen Kombinationen aus ERFVII Transkriptionsfaktoren überprüft werden, ob für die Aktivierung bestimmter Prozesse alle ERFVII Transkriptionsfaktoren vonnöten sind. Außerdem könnte damit untersucht werden, ob ERFVII Transkriptionsfaktoren zur genetischen Regulation untereinander Komplexe bilden. So wurde z.B. RAP2.2 als Partner des Mediator Komplexes isoliert (Ou et al., 2011). Es könnte also auch möglich sein, dass mehrere ERFVII Transkriptionsfaktoren funktionelle Komplexe bilden, um z.B. ihre Wirkung auf die Expression bestimmter Gene zu verstärken.

Auch Redoxregulation könnte eine wichtige Rolle in der Regulation der ERFVII Transkriptionsfaktoren spielen. In Menschen ist die Aktivität der Methionin Aminopeptidase 2, welche unter anderem den initialen Schritt im NERP katalysiert, durch Thioredoxine gesteuert, wodurch sie auf den cytosolischen Redoxstatus reagiert (Chiu et al., 2014). In ähnlicher Weise könnte sich auch der Redoxstatus im Cytosol der Pflanzenzelle auf den NERP oder direkt auf die Oxidation des N-terminalen Cysteins der ERFVII Transkriptionsfaktoren auswirken. Die Verwendung von roGFP-Konstrukten (reduction-oxidation sensitive Green Fluorescent Protein) (Schwarzländer et al., 2008; Meyer et al., 2007; Jiang et al., 2006) sowie von 35S::RAP2.12::GFP Linien (Licausi et al., 2011b) in Verbindung mit oxidierenden und reduzierenden Reagenzien unter Hypoxie könnte Aufschluss über die komplexen Zusammenhänge der Redoxsteuerung bei verringerten Sauerstoffkonzentrationen geben.

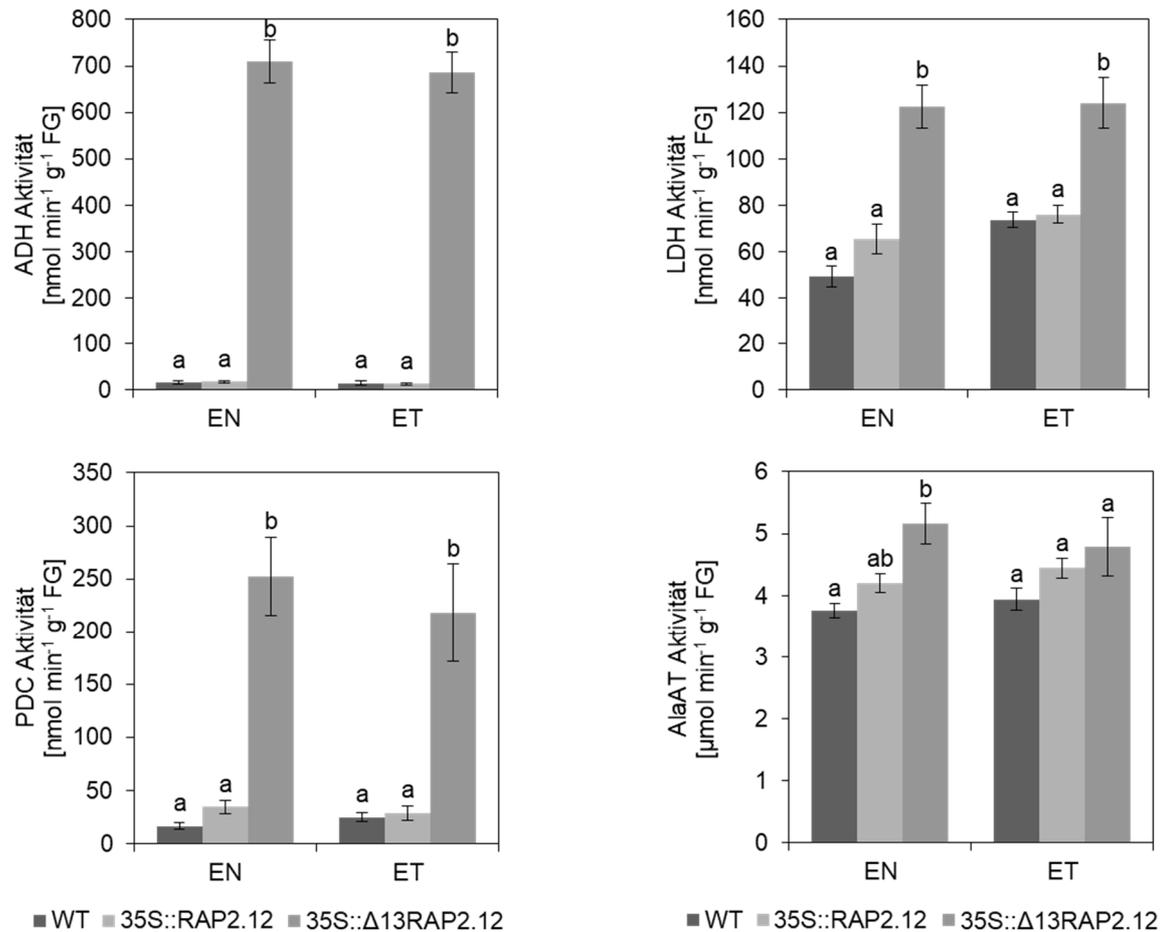
## 5 Anhang

### Ergänzende Abbildungen



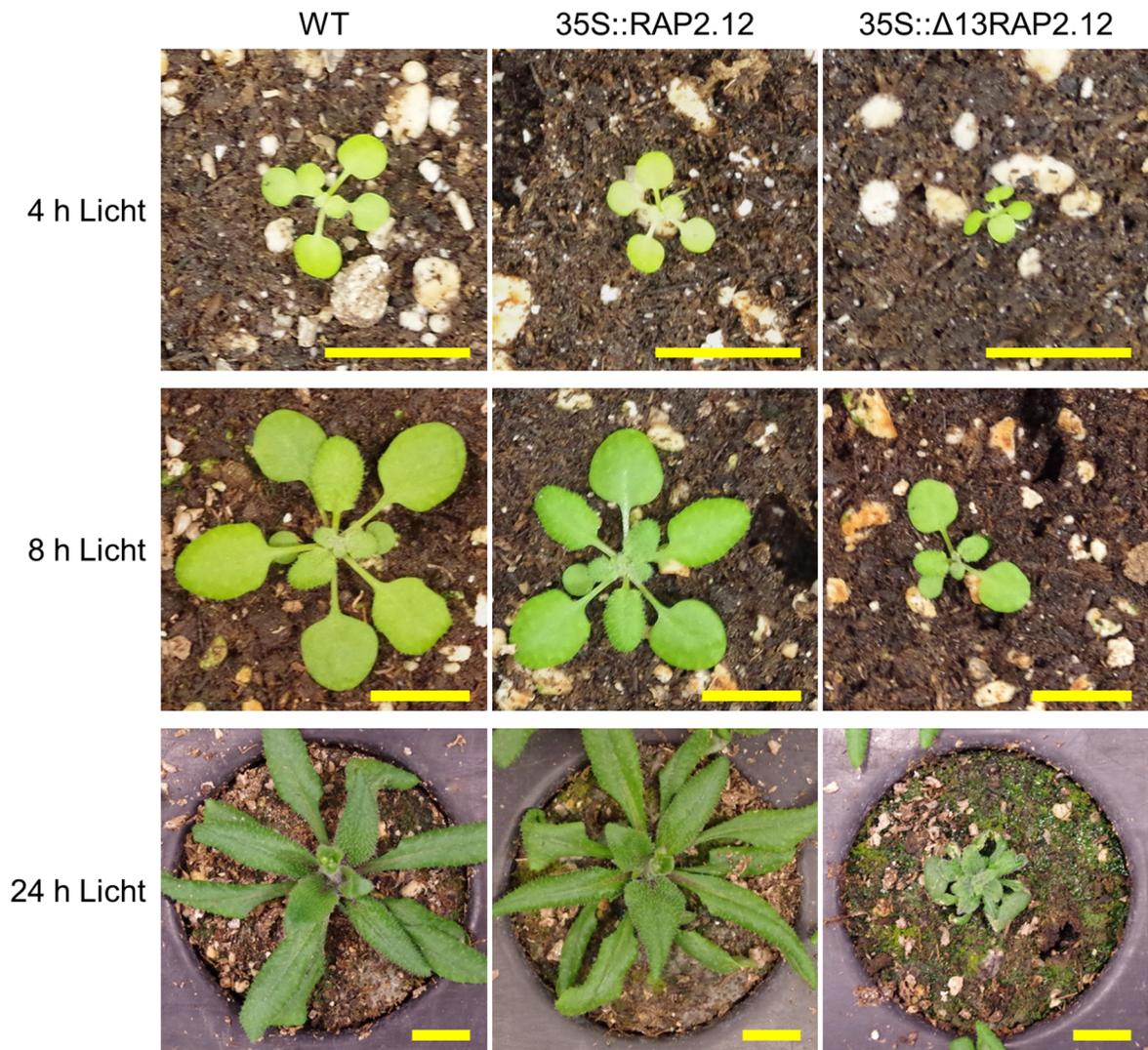
**Anhang Abbildung 1:** Relative Transkriptmengen hypoxischer Markergene in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen am Ende der Dunkelperiode (Ende der Nacht, EN) und am Ende der Lichtperiode (Ende des Tages, ET). Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Rosetten der Pflanzen zum jeweiligen Tageszeitpunkt in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der RNA und Umschreiben dieser in cDNA wurden die relativen Transkriptmengen von *ADH1*, *PDC1*, *HB1*, *SUS4*, *AlaAT1* und *AlaAT2* mittels qRT PCR bestimmt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 8 - 10) mit Standardfehler nach Normalisierung auf die Werte des WT am EN. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

## ANHANG



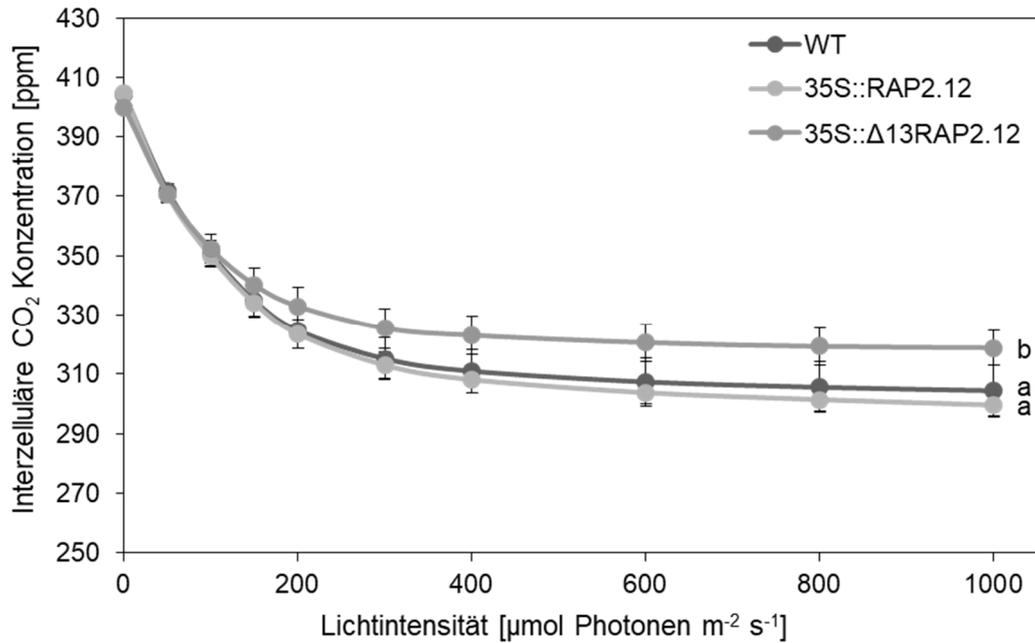
**Anhang Abbildung 2:** Maximale Aktivität von Fermentationsenzymen in WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen am Ende der Dunkelperiode (Ende der Nacht, EN) und am Ende der Lichtperiode (Ende des Tages, ET). Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Rosetten der Pflanzen zum jeweiligen Tageszeitpunkt in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der Proteine wurde die maximale Aktivität der Fermentationsenzyme ADH, PDC, LDH und AlaAT durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch bestimmt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte (n = 8 - 10) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorier ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

ANHANG



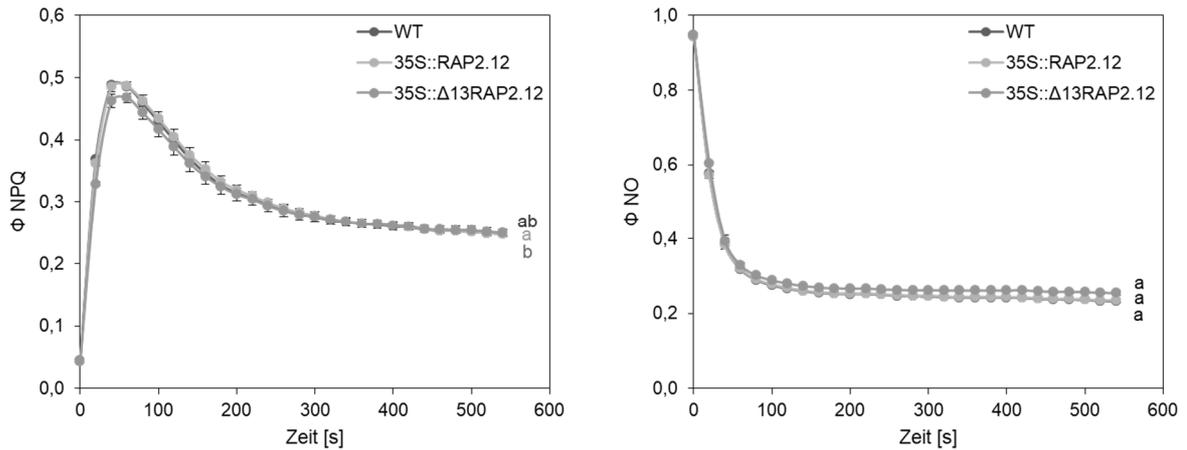
**Anhang Abbildung 3:** Repräsentative Fotos von WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei verschiedenen Tageslängen. Die Dauer der täglichen Lichtperiode betrug 4 h, 8 h oder 24 h. Die Samen wurden auf Erde ausgebracht und das Wachstum der Pflanzen nach 26 Tagen fotografisch dokumentiert. Die Länge des gelben Balkens entspricht jeweils 1 cm.

## ANHANG



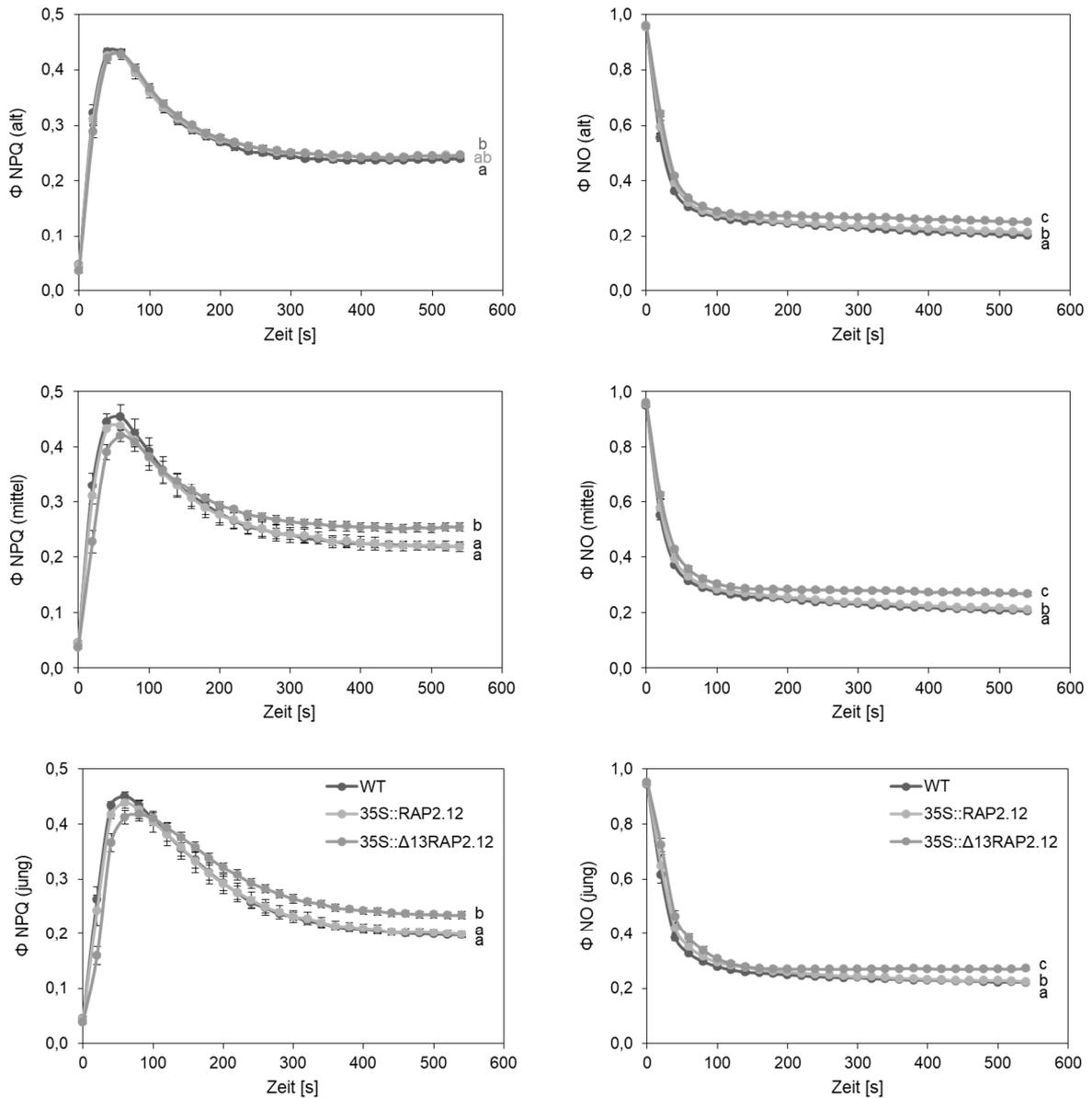
**Anhang Abbildung 4:** Interzelluläre  $\text{CO}_2$  Konzentration in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen bei verschiedenen Lichtstärken. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen nach Dunkeladaption in einem Gaswechsel-Messgerät stärker werdenden Lichtintensitäten ausgesetzt, wobei jeweils nach Stabilisierung der Parameter die interzelluläre  $\text{CO}_2$  Konzentration aufgezeichnet wurde. Der Graph zeigt die Mittelwerte ( $n = 5 - 6$ ) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

## ANHANG



**Anhang Abbildung 5:** Quantenausbeuten der regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi$  NPQ) und der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung ( $\Phi$  NO) des PSII in WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen nach Dunkeladaption in einem PAM Fluoreszenzspektrometer zunächst einem lichtsättigenden Puls ausgesetzt (nicht dargestellt). Im Anschluss wurden alle 20 s  $\Phi$  NPQ und  $\Phi$  NO bei einer dem Wachstumslicht ähnlichen Lichtintensität von  $145 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufgezeichnet. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 9 - 10$ ) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

## ANHANG



**Anhang Abbildung 6:** Quantenausbeuten der regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlösung ( $\Phi$  NPQ) und der nicht-regulierten nicht-photochemischen Fluoreszenzlösung ( $\Phi$  NO) des PSII in alten, mittleren und jungen Blättern von WT, 35S::RAP2.12 und 35S:: $\Delta$ 13RAP2.12 Pflanzen. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen nach Dunkeladaptation in einem PAM Fluoreszenzspektrometer zunächst einem lightsättigenden Puls ausgesetzt (nicht dargestellt). Im Anschluss wurden alle 20 s  $\Phi$  NPQ und  $\Phi$  NO bei einer dem Wachstumslicht ähnlichen Lichtintensität von 145  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufgezeichnet. Die Messpunkte wurden entsprechend des Blattalters gesetzt, dabei entsprachen Blätter mit den Blattnummern 3 - 6 alten, 7 - 11 mittleren und alle darauffolgenden jungen Blättern. Die Graphen zeigen die Mittelwerte ( $n = 5 - 7$ ) mit Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA ( $p < 0,05$ ), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

**Ergänzende Tabellen**

**Anhang Tabelle 1:** Änderungen im Metabolitprofil von WT, 35S::RAP2.12 und 35S::Δ13RAP2.12 Pflanzen bei Normoxie und Hypoxie bezogen auf die Werte des WT bei Normoxie. Nach 5 Wochen Wachstum unter Kurztagbedingungen wurden die Pflanzen im Dunkeln für 16 h entweder normalen oder verringerten Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt und die Rosetten in flüssigem Stickstoff geerntet. Nach Extraktion der polaren Metabolite erfolgte deren Charakterisierung mittels GC-TOF-MS. Für die Quantifizierung der Stärke wurden nach deren Extraktion und enzymatischem Abbau die entstandenen Glukosemoleküle durch Umsetzung geeigneter Substrate photometrisch quantifiziert. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte (n = 8 - 10) mit Standardfehler nach Normalisierung auf die Werte des WT bei Normoxie. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (p < 0,05), wobei signifikante Unterschiede durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind. Die Metabolite sowie Metabolitverhältnisse sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Eine Auswahl der Daten ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Metabolit	Mittelwert ± Standardfehler <small>Einfaktorielle ANOVA</small>					
	Normoxie			Hypoxie		
	WT	35S::RAP2.12	35S::Δ13RAP2.12	WT	35S::RAP2.12	35S::Δ13RAP2.12
3,6-Dimethyl-2,5-piperazinedione	1,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,08 <sup>a</sup>
1,6-Anhydroglucose	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,13 <sup>a</sup>
2-Aminobutyrate	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,43 ± 1,28 <sup>b</sup>	2,02 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,90 ± 0,41 <sup>a</sup>	4,85 ± 0,72 <sup>b</sup>
2-Deoxygalactose	1,00 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,23 <sup>a</sup>
2-Deoxyribofuranose	1,00 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,11 <sup>a</sup>
2-Deoxyribose	1,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,12 <sup>a</sup>
2-Deoxyribose 5-phosphate	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,11 <sup>a</sup>
2-Ketobutyrate	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,19 <sup>a</sup>
2-Ketoisocaproic acid	1,00 ± 0,13 <sup>ab</sup>	0,74 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,26 <sup>b</sup>	2,27 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,40 <sup>a</sup>
3-Cyanoalanine	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,16 <sup>a</sup>	7,11 ± 1,43 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,83 ± 1,10 <sup>a</sup>	8,58 ± 0,96 <sup>b</sup>
3-Hydroxybutyrate	1,00 ± 0,17 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,86 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,11 <sup>b</sup>
3-Ureidopropionic acid	1,00 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,15 <sup>a</sup>
4-Aminobenzoate	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,95 ± 0,19 <sup>b</sup>
5-Methylcytosine	1,00 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,79 ± 0,54 <sup>b</sup>	0,73 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,37 <sup>a</sup>	6,95 ± 1,40 <sup>b</sup>
5-Oxoproline	1,00 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,30 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,26 <sup>b</sup>
Agmatine	1,00 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,60 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,15 <sup>b</sup>
Alanine	1,00 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,49 ± 0,45 <sup>b</sup>	2,74 ± 0,13 <sup>a</sup>	4,62 ± 0,58 <sup>a</sup>	8,17 ± 1,06 <sup>b</sup>
Arabinonate	1,00 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,33 <sup>ab</sup>	1,38 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,13 <sup>b</sup>
Arginine	1,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,18 <sup>a</sup>	7,83 ± 0,86 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,82 <sup>a</sup>	9,92 ± 1,55 <sup>b</sup>
Ascorbate	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,38 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,08 <sup>b</sup>
Asparagine	1,00 ± 0,35 <sup>ab</sup>	0,49 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,38 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,34 <sup>b</sup>
Aspartic acid	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,09 <sup>b</sup>
beta-Alanine	1,00 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,94 ± 0,90 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,81 <sup>a</sup>	6,19 ± 1,04 <sup>b</sup>
cis-Sinapic acid	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,13 <sup>a</sup>
Citrate	1,00 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,39 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,36 <sup>a</sup>	4,06 ± 0,47 <sup>b</sup>
cyclo-Serine	1,00 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,22 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,24 <sup>b</sup>
Cytosine	1,00 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,17 <sup>a</sup>	11,89 ± 2,15 <sup>b</sup>	1,46 ± 0,18 <sup>a</sup>	3,55 ± 1,97 <sup>a</sup>	17,16 ± 1,96 <sup>b</sup>
Dehydroascorbate	1,00 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,26 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,19 <sup>ab</sup>	0,29 ± 0,05 <sup>b</sup>
D-Glucopyranose	1,00 ± 0,37 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,59 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>a</sup>
Dihydroxyacetone	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,23 <sup>a</sup>
D-Xylobiose	1,00 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,67 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>
Erythritol	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,16 <sup>b</sup>
Ethanolamine	1,00 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,73 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,16 <sup>ab</sup>	2,12 ± 0,32 <sup>b</sup>

## ANHANG

Fructose	1,00 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,34 <sup>a</sup>	4,12 ± 0,84 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,47 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,47 <sup>a</sup>
Fructose 6-phosphate	1,00 ± 0,15 <sup>ab</sup>	0,72 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,55 <sup>b</sup>
Fucose	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,80 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,86 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,07 <sup>b</sup>
Fumarate	1,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,14 <sup>a</sup>
GABA	1,00 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,36 ± 0,79 <sup>b</sup>	0,81 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,51 <sup>a</sup>	6,26 ± 0,97 <sup>b</sup>
Galactinol	1,00 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,22 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>a</sup>
Galactonate	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,09 <sup>a</sup>
Galactose	1,00 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,08 <sup>b</sup>
Galactose 6-phosphate	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,60 ± 0,52 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,25 <sup>ab</sup>	2,92 ± 0,43 <sup>b</sup>
Gentiobiose	1,00 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,32 <sup>ab</sup>
Glucarate-1,4-lactone	1,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,26 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,15 <sup>b</sup>
Glucoheptose	1,00 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,19 <sup>a</sup>
Gluconate	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,18 ± 1,34 <sup>b</sup>	1,10 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,14 ± 2,39 <sup>ab</sup>	10,18 ± 2,51 <sup>b</sup>
Glucose	1,00 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>b</sup>
Glucose 6-phosphate	1,00 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,36 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,25 <sup>a</sup>
Glutamic acid	1,00 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,24 <sup>b</sup>
Glutamine	1,00 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,35 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,29 <sup>a</sup>	3,11 ± 0,43 <sup>b</sup>
Glutarate	1,00 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,31 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,27 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,61 <sup>a</sup>
Glycerate	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,18 <sup>ab</sup>	1,99 ± 0,32 <sup>b</sup>
Glycerol	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,29 <sup>b</sup>
Glycerol 3-phosphate	1,00 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,78 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,21 <sup>b</sup>
Glycerophosphoglycerol	1,00 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,12 <sup>a</sup>
Glycine	1,00 ± 0,37 <sup>ab</sup>	0,45 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,32 <sup>b</sup>	1,16 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,17 <sup>ab</sup>	2,23 ± 0,23 <sup>b</sup>
Helicin	1,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,63 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,15 <sup>a</sup>
Homoserine	1,00 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,33 <sup>a</sup>
Isoleucine	1,00 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,86 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,21 <sup>a</sup>
Isomaltose	1,00 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,24 <sup>a</sup>
Lactate	1,00 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,90 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,37 <sup>b</sup>	1,14 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,98 ± 1,14 <sup>ab</sup>	6,43 ± 1,44 <sup>b</sup>
Leucine	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,43 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,39 <sup>a</sup>	4,38 ± 0,61 <sup>b</sup>
Lysine	1,00 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,35 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,27 <sup>b</sup>
Malate	1,00 ± 0,26 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,45 <sup>a</sup>	3,87 ± 1,10 <sup>b</sup>
Maltitol	1,00 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,31 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,07 <sup>a</sup>
Maltose	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,64 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,07 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,18 <sup>a</sup>
Mannose	1,00 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,11 <sup>b</sup>
Mannose 1-phosphate	1,00 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,51 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,22 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,22 <sup>a</sup>
Mannose 6-phosphate	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,61 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,13 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,82 <sup>a</sup>
Melibiose	1,00 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,25 <sup>ab</sup>	0,08 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>
Methionine	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,93 ± 0,31 <sup>b</sup>	1,51 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,23 <sup>a</sup>	3,78 ± 0,42 <sup>b</sup>
Monomethylphosphate	1,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,36 <sup>b</sup>
myo-Inositol	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,05 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>b</sup>
N-Acetylmannosamine	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,07 <sup>ab</sup>
N-Acetylneuramate	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,14 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,12 <sup>b</sup>
Nicotinamide	1,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,17 <sup>a</sup>
Nicotinate	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,28 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,30 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,33 <sup>b</sup>
O-Acetylserine	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,22 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,30 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,39 <sup>b</sup>
Ornithine	1,00 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,25 <sup>a</sup>	8,43 ± 2,21 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,48 <sup>a</sup>	8,23 ± 1,90 <sup>b</sup>
Ornithine-1,5-lactam	1,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,08 <sup>a</sup>	7,22 ± 0,76 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,92 <sup>a</sup>	9,15 ± 1,24 <sup>b</sup>
Phenylalanine	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,30 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,33 <sup>b</sup>
Phosphogluconate	1,00 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,06 <sup>b</sup>
Picolinate	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,33 <sup>b</sup>	1,15 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,25 <sup>b</sup>
Pipecolic acid	1,00 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,17 <sup>a</sup>	8,31 ± 2,75 <sup>b</sup>	1,95 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,63 ± 1,01 <sup>a</sup>	17,69 ± 7,43 <sup>b</sup>

## ANHANG

<b>Proline</b>	1,00 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,49 <sup>b</sup>	1,49 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,88 ± 1,13 <sup>a</sup>	7,61 ± 1,24 <sup>b</sup>
<b>Putrescine</b>	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,35 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,07 ± 0,04 <sup>ab</sup>
<b>Pyruvate</b>	1,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,30 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,52 <sup>ab</sup>	3,91 ± 0,89 <sup>b</sup>
<b>Raffinose</b>	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,06 ± 0,73 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Ribose</b>	1,00 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>Salicin</b>	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,09 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,17 <sup>a</sup>
<b>Salicylic acid glucoside</b>	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,09 ± 1,56 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,35 <sup>a</sup>	5,85 ± 1,29 <sup>b</sup>
<b>Secologanin</b>	1,00 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>Serine</b>	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,98 ± 0,34 <sup>b</sup>
<b>Shikimate</b>	1,00 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,57 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>Spermidine</b>	1,00 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,26 <sup>a</sup>
<b>Starch</b>	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,51 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>Succinate</b>	1,00 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>Sucrose</b>	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,42 <sup>a</sup>
<b>Threonate</b>	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,20 <sup>a</sup>
<b>Threonine</b>	1,00 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,15 ± 0,24 <sup>b</sup>
<b>Threose</b>	1,00 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,46 ± 0,30 <sup>b</sup>	1,67 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,50 <sup>a</sup>	4,07 ± 0,39 <sup>b</sup>
<b>trans-1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid</b>	1,00 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,32 <sup>a</sup>
<b>Trehalose</b>	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>Tryptophan</b>	1,00 ± 0,17 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,44 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,29 <sup>ab</sup>	0,85 ± 0,19 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,45 <sup>b</sup>
<b>Tyrosine</b>	1,00 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>Urate</b>	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,24 <sup>a</sup>
<b>Urea</b>	1,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,39 ± 0,99 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,47 ± 0,55 <sup>b</sup>
<b>Valine</b>	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,38 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,31 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,51 <sup>b</sup>
<b>Xylose</b>	1,00 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,16 <sup>a</sup>
<b>α,β-Trehalose</b>	1,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,54 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,28 <sup>b</sup>
<b>α-Methyl mannopyranoside</b>	1,00 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,13 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>β,β-Trehalose</b>	1,00 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,17 <sup>a</sup>
<b>Ascorbate/Dehydroascorbate (red/ox)</b>	1,00 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,28 <sup>a</sup>
<b>Succinate/Fumarate</b>	1,00 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,21 <sup>a</sup>	1,83 ± 0,16 <sup>b</sup>
<b>Aspartic acid/Asparagine</b>	1,00 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,43 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,61 <sup>a</sup>
<b>Glutamic acid/Glutamine</b>	1,00 ± 0,25 <sup>ab</sup>	1,29 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>a</sup>

## 6 Literaturverzeichnis

**Abbas M, Alabadi D, and Blázquez MA** (2013) Differential growth at the apical hook: all roads lead to auxin. *Front Plant Sci* **4**: 441.

**Abbas M, Berckhan S, Rooney DJ, Gibbs DJ, Vicente Conde J, Sousa Correia C, Bassel GW, Marín-de la Rosa N, León J, Alabadi D, Blázquez MA, and Holdsworth MJ** (2015) Oxygen sensing coordinates photomorphogenesis to facilitate seedling survival. *Curr Biol* **25**(11): 1483-1488.

**Andriankaja M, Dhondt S, De Bodt S, Vanhaeren H, Coppens F, De Milde L, Mühlenbock P, Skirycz A, Gonzalez N, Beemster GT, and Inzé D** (2012) Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Dev Cell* **22**(1): 64-78.

**António C, Pöpke C, Rocha M, Diab H, Limami AM, Obata T, Fernie AR, and van Dongen JT** (2016) Regulation of Primary Metabolism in Response to Low Oxygen Availability as Revealed by Carbon and Nitrogen Isotope Redistribution. *Plant Physiol* **170**(1): 43-56.

**Armstrong J, Jones RE, and Armstrong W** (2006) Rhizome phyllosphere oxygenation in Phragmites and other species in relation to redox potential, convective gas flow, submergence and aeration pathways. *New Phytol* **172**(4): 719-731.

**Armstrong W, Strange ME, Cringle S, and Beckett PM** (1994) Microelectrode and modelling study of oxygen distribution in roots *Annu Bot* **74**: 287-299.

**Bachmair A, Finley D, and Varshavsky A** (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**(4773): 179-186.

**Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voesenek LA, and van Dongen JT** (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends Plant Sci* **17**(3): 129-138.

**Bailey-Serres J and Voesenek LA** (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 313-339.

**Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89-113.

**Baker NR and Rosenqvist E** (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* **55**(403): 1607-1621.

**Banti V, Loreti E, Novi G, Santaniello A, Alpi A, and Perata P** (2008) Heat acclimation and cross-tolerance against anoxia in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **31**(7): 1029-1037.

**Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, and Perata P** (2010) The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**(3): 1471-1483.

**Baxter-Burrell A, Yang Z, Springer PS, and Bailey-Serres J** (2002) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science* **296**(5575): 2026-2028.

**Bernsdorff F, Döring AC, Gruner K, Schuck S, Bräutigam A, and Zeier J** (2016) Picecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways. *Plant Cell* **28**(1): 102-129.

**Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, Zrenner R, and Smith AM** (2007) Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J* **49**(5): 810-828.

**Blokhina O, Virolainen E, and Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* **91**(2): 179-194.

**Bologa KL, Fernie AR, Leisse A, Loureiro ME, and Geigenberger P** (2003) A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. *Plant Physiol* **132**(4): 2058-2072.

**Borisjuk L and Rolletschek H** (2009) The oxygen status of the developing seed. *New Phytol* **182**(1): 17-30.

**Bouny JM and Saglio PH** (1996) Glycolytic Flux and Hexokinase Activities in Anoxic Maize Root Tips Acclimated by Hypoxic Pretreatment. *Plant Physiol* **111**(1): 187-194.

**Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJ, Larive CK, and Bailey-Serres J** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **56**(5): 743-755.

**Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira RB, and Bailey-Serres J** (2005) Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann Bot* **96**(4): 647-660.

**Bui LT, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, and Licausi F** (2015) Constitutively expressed ERF-VII transcription factors redundantly activate the core anaerobic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **236**: 37-43.

**Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, and Fernandez E** (2017) Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science* **22**(2): 163-174.

**Chen H, Qualls RG, and Blank RR** (2005) Effect of soil flooding on photosynthesis, carbohydrate partitioning and nutrient uptake in the invasive exotic *Lepidium latifolium*. *Aquatic Botany* **82**(4): 250-268.

**Chiu J, Wong JWH, and Hogg PJ** (2014) Redox Regulation of Methionine Aminopeptidase 2 Activity. *Journal of Biological Chemistry* **289**(21): 15035-15043.

**Cho YH, Hong JW, Kim EC, and Yoo SD** (2012) Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol* **158**(4): 1955-1964.

**Davière JM, Wild M, Regnault T, Baumberger N, Eisler H, Genschik P, and Achard P** (2014) Class I TCP-DELLA interactions in inflorescence shoot apex determine plant height. *Curr Biol* **24**(16): 1923-1928.

**Day DA, Neuburger M, and Douce R** (1985) Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from Pea leaves. *Aust J Plant Physiol* **12**: 219-228.

**De Schutter K, Joubès J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiychuk E, Van Der Schueren E, Beeckman T, Kushnir S, Inzé D, and De Veylder L** (2007) *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* **19**(1): 211-225.

**de Sousa CAF and Sodek L** (2003) Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environmental and Experimental Botany* **50**(1): 1-8.

**Del-Saz NF, Ribas-Carbo M, McDonald AE, Lambers H, Fernie AR, and Florez-Sarasa I** (2018) An In Vivo Perspective of the Role(s) of the Alternative Oxidase Pathway. *Trends Plant Sci* **23**(3): 206-219.

**Díaz-Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV, and Foyer CH** (2010) A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J* **431**: 169-178.

**Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, and Hill RD** (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *The Plant Journal* **35**(6): 763-770.

**Ellis MH, Dennis ES, and Peacock WJ** (1999) Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiol* **119**(1): 57-64.

**Else MA, Janowiak F, Atkinson CJ, and Jackson MB** (2009) Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Ann Bot* **103**(2): 313-323.

**Erbán A, Schauer N, Fernie AR, and Kopka J** (2007) Nonsupervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiles. *Methods Mol Biol* **358**: 19-38.

**Fukao T and Bailey-Serres J** (2004) Plant responses to hypoxia--is survival a balancing act? *Trends Plant Sci* **9**(9): 449-456.

**Fukao T, Xu K, Ronald PC, and Bailey-Serres J** (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *Plant Cell* **18**(8): 2021-2034.

**Garzón M, Eifler K, Faust A, Scheel H, Hofmann K, Koncz C, Yephremov A, and Bachmair A** (2007) PRT6/At5g02310 encodes an Arabidopsis ubiquitin ligase of the N-end rule pathway with arginine specificity and is not the CER3 locus. *FEBS Lett* **581**(17): 3189-3196.

**Gasch P, Fundinger M, Müller JT, Lee T, Bailey-Serres J, and Mustroph A** (2016) Redundant ERF-VII Transcription Factors Bind to an Evolutionarily Conserved cis-Motif to Regulate Hypoxia-Responsive Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**(1): 160-180.

**Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* **6**(3): 247-256.

**Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, and Stitt M** (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Biological Chemistry* **381**(8): 723-740.

**Geiger DR and Servaites JC** (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu Rev Plant Biol* **45**: 235-256.

**Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, and Jacquot JP** (2004) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(40): 14545-14550.

**Gibbs DJ, Conde JV, Berckhan S, Prasad G, Mendiando GM, and Holdsworth MJ** (2015) Group VII Ethylene Response Factors Coordinate Oxygen and Nitric Oxide Signal Transduction and Stress Responses in Plants. *Plant Physiol* **169**(1): 23-31.

**Gibbs DJ, Lee SC, Isa NM, Gramuglia S, Fukao T, Bassel GW, Correia CS, Corbineau F, Theodoulou FL, Bailey-Serres J, and Holdsworth MJ** (2011) Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. *Nature* **479**(7373): 415-418.

**Gibbs DJ, Md Isa N, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiando GM, Berckhan S, Marín-de la Rosa N, Vicente Conde J, Sousa Correia C, Pearce SP, Bassel GW, Hamali B, Talloji P, Tomé DF, Coego A, Beynon J, Alabadi D, Bachmair A, León J, Gray JE, Theodoulou FL, and Holdsworth MJ** (2014) Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol Cell* **53**(3): 369-379.

**Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, and Stitt M** (2004) A Robot-based platform to measure multiple

enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**(12): 3304-3325.

**Giuntoli B, Lee SC, Licausi F, Kosmacz M, Oosumi T, van Dongen JT, Bailey-Serres J, and Perata P** (2014) A trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in Arabidopsis. *PLoS Biol* **12**(9): e1001950.

**Giuntoli B and Perata P** (2018) Group VII Ethylene Response Factors in Arabidopsis: Regulation and Physiological Roles. *Plant Physiol* **176**(2): 1143-1155.

**Giuntoli B, Shukla V, Maggiorelli F, Giorgi FM, Lombardi L, Perata P, and Licausi F** (2017) Age-dependent regulation of ERF-VII transcription factor activity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **40**(10): 2333-2346.

**Gonzali S, Loreti E, Cardarelli F, Novi G, Parlanti S, Pucciariello C, Bassolino L, Banti V, Licausi F, and Perata P** (2015) Universal stress protein HRU1 mediates ROS homeostasis under anoxia. *Nat Plants* **1**: 15151.

**Graciet E, Walter F, Ó'Maoiléidigh DS, Pollmann S, Meyerowitz EM, Varshavsky A, and Wellmer F** (2009) The N-end rule pathway controls multiple functions during Arabidopsis shoot and leaf development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32): 13618-13623.

**Graciet E and Wellmer F** (2010) The plant N-end rule pathway: structure and functions. *Trends Plant Sci* **15**(8): 447-453.

**Guglielminetti L, Perata P, and Alpi A** (1995) Effect of Anoxia on Carbohydrate Metabolism in Rice Seedlings. *Plant Physiol* **108**(2): 735-741.

**Gupta KJ, Shah JK, Brotman Y, Jahnke K, Willmitzer L, Kaiser WM, Bauwe H, and Igamberdiev AU** (2012) Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. *J Exp Bot* **63**(4): 1773-1784.

**Hajirezaei MR, Peisker M, Tschiersch H, Palatnik JF, Valle EM, Carrillo N, and Sonnewald U** (2002) Small changes in the activity of chloroplastic NADP(+)-dependent

ferredoxin oxidoreductase lead to impaired plant growth and restrict photosynthetic activity of transgenic tobacco plants. *Plant J* **29**(3): 281-293.

**Han SK, Sang Y, Rodrigues A, F2010 B, Wu MF, Rodriguez PL, and Wagner D** (2012) The SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA represses abscisic acid responses in the absence of the stress stimulus in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**(12): 4892-4906.

**Hanna J and Finley D** (2007) A Proteasome For All Occasions. *FEBS letters* **581**(15): 2854-2861.

**Harashima H and Sugimoto K** (2016) Integration of developmental and environmental signals into cell proliferation and differentiation through RETINOBLASTOMA-RELATED 1. *Curr Opin Plant Biol* **29**: 95-103.

**Hardie DG, Ross FA, and Hawley SA** (2012) AMPK - a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(4): 251-262.

**Hatch MD and Mau SL** (1973) Activity, Location, and Role of Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase Isoenzymes in Leaves with C4 Pathway Photosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **156**(1): 195-206.

**Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H, and Ashikari M** (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**: 1026.

**Hendriks JH, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, and Geigenberger P** (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiol* **133**(2): 838-849.

**Herrera A** (2013) Responses to flooding of plant water relations and leaf gas exchange in tropical tolerant trees of a black-water wetland. *Front Plant Sci* **4**: 106.

**Hess M, Barralis G, Bleiholder H, Buhr L, Eggers TH, Hack H, and Strauss R** (1997) Use of the extended BBCH scale—general for the descriptions of the growth stages of mono; and dicotyledonous weed species. *Weed Res* **37**: 433-441.

**Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES, Sauter M, and Dolferus R** (2010) Arabidopsis RAP2.2: an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol* **153**(2): 757-772.

**Ho QT, Verboven P, Verlinden BE, Herremans E, Wevers M, Carmeliet J, and Nicolaï BM** (2011) A three-dimensional multiscale model for gas exchange in fruit. *Plant Physiol* **155**(3): 1158-1168.

**Ho QT, Verboven P, Verlinden BE, Schenk A, Delele MA, Rolletschek H, Vercammen J, and Nicolaï BM** (2010) Genotype effects on internal gas gradients in apple fruit. *J Exp Bot* **61**(10): 2745-2755.

**Holdsworth MJ, Bentsink L, and Soppe WJ** (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol* **179**(1): 33-54.

**Horvath BM, Kourova H, Nagy S, Nemeth E, Magyar Z, Papdi C, Ahmad Z, Sanchez-Perez GF, Perilli S, Blilou I, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Meszaros T, Binarova P, Bogre L, and Scheres B** (2017) Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J* **36**(9): 1261-1278.

**Hsu FC, Chou MY, Chou SJ, Li YR, Peng HP, and Shih MC** (2013) Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**(7): 2699-2713.

**Huang S, Colmer TD, and Millar AH** (2008) Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPI? *Trends Plant Sci* **13**(5): 221-227.

**Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, and Dennis ES** (2002) Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 17197-17202.

**Iannelli MA, Van Breusegem F, Van Montagu M, Inzé D, and Massacci A** (1999) Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. *J Exp Bot* **50**(333): 523-532.

**Igamberdiev AU and Hill RD** (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J Exp Bot* **55**(408): 2473-2482.

**Im JH, Cho YH, Kim GD, Kang GH, Hong JW, and Yoo SD** (2014) Inverse modulation of the energy sensor Snf1-related protein kinase 1 on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **37**(10): 2303-2312.

**Jiang K, Schwarzer C, Lally E, Zhang S, Ruzin S, Machen T, Remington SJ, and Feldman L** (2006) Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**(2): 397-403.

**John CD and Greenway H** (1976) Alcoholic fermentation and activity of some enzymes in rice roots under anaerobiosis. *Aust J Plant Physiol* **3**(3): 325-336.

**Jung J, Won SY, Suh SC, Kim H, Wing R, Jeong Y, Hwang I, and Kim M** (2007) The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta* **225**(3): 575-588.

**Kärkönen A and Kuchitsu K** (2015) Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* **112**: 22-32.

**Kelliher T and Walbot V** (2012) Hypoxia triggers meiotic fate acquisition in maize. *Science* **337**(6092): 345-348.

**Klecker M, Gasch P, Peisker H, Dörmann P, Schlicke H, Grimm B, and Mustroph A** (2014) A Shoot-Specific Hypoxic Response of *Arabidopsis* Sheds Light on the Role of the Phosphate-Responsive Transcription Factor PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1. *Plant Physiol* **165**(2): 774-790.

**Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, Peacock WJ, Dolferus R, and Dennis ES** (2002) Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. *Plant Cell* **14**(10): 2481-2494.

**Klughammer C and Schreiber U** (2008) Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* **1**: 27-35.

- Kosmacz M, Parlanti S, Schwarzländer M, Kragler F, Licausi F, and Van Dongen JT** (2015) The stability and nuclear localization of the transcription factor RAP2.12 are dynamically regulated by oxygen concentration. *Plant Cell Environ* **38**(6): 1094-1103.
- Lakshmanan M, Zhang Z, Mohanty B, Kwon JY, Choi HY, Nam HJ, Kim DI, and Lee DY** (2013) Elucidating rice cell metabolism under flooding and drought stresses using flux-based modeling and analysis. *Plant Physiol* **162**(4): 2140-2150.
- Lee KW, Chen PW, and Yu SM** (2014) Metabolic adaptation to sugar/O<sub>2</sub> deficiency for anaerobic germination and seedling growth in rice. *Plant Cell Environ* **37**(10): 2234-2244.
- Li ZY, Li B, and Dong AW** (2012) The Arabidopsis transcription factor AtTCP15 regulates endoreduplication by modulating expression of key cell-cycle genes. *Mol Plant* **5**(1): 270-280.
- Licausi F, Giorgi FM, Schmäzlin E, Usadel B, Perata P, van Dongen JT, and Geigenberger P** (2011a) HRE-type genes are regulated by growth-related changes in internal oxygen concentrations during the normal development of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Plant Cell Physiol* **52**(11): 1957-1972.
- Licausi F, Kosmacz M, Weits DA, Giuntoli B, Giorgi FM, Voesenek LA, Perata P, and van Dongen JT** (2011b) Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature* **479**(7373): 419-422.
- Licausi F, van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, and Perata P** (2010) HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **62**(2): 302-315.
- Limami AM, Glévarec G, Ricoult C, Cliquet JB, and Planchet E** (2008) Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *J Exp Bot* **59**(9): 2325-2335.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, and Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**(1): 387-396.
- Liu F, Vantoai T, Moy LP, Bock G, Linford LD, and Quackenbush J** (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**(3): 1115-1129.

- Liu Z, Cheng R, Xiao W, Guo Q, and Wang N** (2014) Effect of off-season flooding on growth, photosynthesis, carbohydrate partitioning, and nutrient uptake in *Distylium chinense*. *PLoS One* **9**(9): e107636.
- Lopez-Molina L, Mongrand S, and Chua NH** (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4782-4787.
- Loreti E, Valeri MC, Novi G, and Perata P** (2018) Gene Regulation and Survival under Hypoxia Requires Starch Availability and Metabolism. *Plant Physiol* **176**(2): 1286-1298.
- Loreti E, van Veen H, and Perata P** (2016) Plant responses to flooding stress. *Curr Opin Plant Biol* **33**: 64-71.
- Lu D, Wang T, Persson S, Mueller-Roeber B, and Schippers JH** (2014) Transcriptional control of ROS homeostasis by KUODA1 regulates cell expansion during leaf development. *Nat Commun* **5**: 3767.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, and Kopka J** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**(5): 732-737.
- Magyar Z, Horváth B, Khan S, Mohammed B, Henriques R, De Veylder L, Bakó L, Scheres B, and Bögre L** (2012) *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J* **31**(6): 1480-1493.
- Marín-de la Rosa N, Sotillo B, Miskolczi P, Gibbs DJ, Vicente J, Carbonero P, Oñate-Sánchez L, Holdsworth MJ, Bhalerao R, Alabadi D, and Blázquez MA** (2014) Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiol* **166**(2): 1022-1032.
- Martín-Trillo M and Cubas P** (2010) TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* **15**(1): 31-39.
- Maxwell K and Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* **51**(345): 659-668.

**Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, and Hell R** (2007) Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* **52**(5): 973-986.

**Miyadera H, Shiomi K, Ui H, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Miyoshi H, Osanai A, Kita K, and Ōmura S** (2003) Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 473-477.

**Mommer L and Visser EJW** (2005) Underwater Photosynthesis in Flooded Terrestrial Plants: A Matter of Leaf Plasticity. *Annals of Botany* **96**(4): 581-589.

**Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzländer M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TC, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, and Finkemeier I** (2008) Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol* **147**(1): 101-114.

**Mustroph A, Barding GA, Jr., Kaiser KA, Larive CK, and Bailey-Serres J** (2014) Characterization of distinct root and shoot responses to low-oxygen stress in *Arabidopsis* with a focus on primary C- and N-metabolism. *Plant Cell Environ* **37**(10): 2366-2380.

**Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJ, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, and Bailey-Serres J** (2009) Profiling transcriptomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(44): 18843-18848.

**Nagai K, Hattori Y, and Ashikari M** (2010) Stunt or elongate? Two opposite strategies by which rice adapts to floods. *Journal of Plant Research* **123**(3): 303-309.

**Narsai R, Howell KA, Carroll A, Ivanova A, Millar AH, and Whelan J** (2009) Defining Core Metabolic and Transcriptomic Responses to Oxygen Availability in Rice Embryos and Young Seedlings. *Plant Physiology* **151**(1): 306-322.

**Narsai R, Rocha M, Geigenberger P, Whelan J, and van Dongen JT** (2011) Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytol* **190**(2): 472-487.

**Návarová H, Bernsdorff F, Döring AC, and Zeier J** (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**(12): 5123-5141.

**Nicolas M and Cubas P** (2016) TCP factors: new kids on the signaling block. *Curr Opin Plant Biol* **33**: 33-41.

**Nishiyama Y, Yamamoto H, Allakhverdiev SI, Inaba M, Yokota A, and Murata N** (2001) Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J* **20**(20): 5587-5594.

**Ou B, Yin K-Q, Liu S-N, Yang Y, Gu T, Wing Hui JM, Zhang L, Miao J, Kondou Y, Matsui M, Gu H-Y, and Qu L-J** (2011) A High-Throughput Screening System for *Arabidopsis* Transcription Factors and Its Application to Med25-Dependent Transcriptional Regulation. *Molecular Plant* **4**(3): 546-555.

**Papdi C, Pérez-Salamó I, Joseph MP, Giuntoli B, Bögre L, Koncz C, and Szabados L** (2015) The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes RAP2.12, RAP2.2 and RAP2.3. *Plant J* **82**(5): 772-784.

**Park M, Yim H, Park H, Lim J, Kim SH, and Hwang Y** (2010) Interference with oxidative phosphorylation enhances anoxic expression of rice  $\alpha$ -amylase genes through abolishing sugar regulation. *J Exp Bot* **61**(12): 3235-3244.

**Pellny TK, Locato V, Diaz Vivancos P, Markovic J, De Gara L, Pallardó FV, and Foyer CH** (2009) Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture. *Mol Plant* **2**(3): 442-456.

**Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**(9): 2002-2007.

**Pierik R, de Wit M, and Voesenek LA** (2011) Growth-mediated stress escape: convergence of signal transduction pathways activated upon exposure to two different environmental stresses. *New Phytologist* **189**(1): 122-134.

**Pucciariello C and Perata P** (2017) New insights into reactive oxygen species and nitric oxide signalling under low oxygen in plants. *Plant Cell Environ* **40**(4): 473-482.

**Qi H, Xia FN, Xie LJ, Yu LJ, Chen QF, Zhuang XH, Wang Q, Li F, Jiang L, Xie Q, and Xiao S** (2017) TRAF Family Proteins Regulate Autophagy Dynamics by Modulating AUTOPHAGY PROTEIN6 Stability in Arabidopsis. *Plant Cell* **29**(4): 890-911.

**Queval G and Noctor G** (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal Biochem* **363**(1): 58-69.

**Rahman M, Grover A, Peacock WJ, Dennis ES, and Ellis MH** (2001) Effects of manipulation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase levels on the submergence tolerance of rice. *Functional Plant Biology* **28**(12).

**Resentini F, Felipo-Benavent A, Colombo L, Blázquez MA, Alabadi D, and Masiero S** (2015) TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **8**(3): 482-485.

**Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, and Siedow JN** (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol* **141**(2): 357-366.

**Riber W, Müller JT, Visser EJ, Sasidharan R, Voesenek LA, and Mustroph A** (2015) The greening after extended darkness1 is an N-end rule pathway mutant with high tolerance to submergence and starvation. *Plant Physiol* **167**(4): 1616-1629.

**Ricoult C, Echeverria LO, Cliquet JB, and Limami AM** (2006) Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* **57**(12): 3079-3089.

**Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, and van Dongen JT** (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**(3): 1501-1513.

**Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, and Fernie AR** (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **13**(1): 11-29.

**Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K** (2002) 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**(3): 998-1009.

**Sand-Jensen K and Frost-Christensen H** (1999) Plant growth and photosynthesis in the transition zone between land and stream. *Aquatic Botany* **63**(1): 23-35.

**Sasidharan R and Mustroph A** (2011) Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. *Plant Cell* **23**(12): 4173-4183.

**Schaffner W** (1988) Gene regulation. A hit-and-run mechanism for transcriptional activation? *Nature* **336**: 427.

**Schippers JH, Foyer CH, and van Dongen JT** (2016) Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Curr Opin Plant Biol* **29**: 121-128.

**Schwarzländer M, Fricker MD, Müller C, Marty L, Brach T, Novak J, Sweetlove LJ, Hell R, and Meyer AJ** (2008) Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells. *J Microsc* **231**(2): 299-316.

**Selinski J, Scheibe R, Day DA, and Whelan J** (2018) Alternative Oxidase Is Positive for Plant Performance. *Trends Plant Sci* **23**(7): 588-597.

**Shapiguzov A, Vainonen JP, Wrzaczek M, and Kangasjärvi J** (2012) ROS-talk - how the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Front Plant Sci* **3**: 292.

**Shingaki-Wells R, Millar AH, Whelan J, and Narsai R** (2014) What happens to plant mitochondria under low oxygen? An omics review of the responses to low oxygen and reoxygenation. *Plant Cell Environ* **37**(10): 2260-2277.

**Shingaki-Wells RN, Huang S, Taylor NL, Carroll AJ, Zhou W, and Millar AH** (2011) Differential molecular responses of rice and wheat coleoptiles to anoxia reveal novel

metabolic adaptations in amino acid metabolism for tissue tolerance. *Plant Physiol* **156**(4): 1706-1724.

**Sorenson R and Bailey-Serres J** (2014) Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(6): 2373-2378.

**Steffens B, Geske T, and Sauter M** (2011) Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *New Phytol* **190**(2): 369-378.

**Steffens B and Rasmussen A** (2016) The Physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiol* **170**(2): 603-617.

**Subbaiah CC, Bush DS, and Sachs MM** (1998) Mitochondrial contribution to the anoxic Ca<sup>2+</sup> signal in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol* **118**(3): 759-771.

**Tadege M, Dupuis II, and Kuhlemeier C** (1999) Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci* **4**(8): 320-325.

**Thormählen I, Ruber J, von Roepenack-Lahaye E, Ehrlich SM, Massot V, Hümmer C, Tezycka J, Issakidis-Bourguet E, and Geigenberger P** (2013) Inactivation of thioredoxin f1 leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of Arabidopsis plants. *Plant Cell Environ* **36**(1): 16-29.

**Trethewey RN, Geigenberger P, Riedel K, Hajirezaei MR, Sonnewald U, Stitt M, Riesmeier JW, and Willmitzer L** (1998) Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant J* **15**(1): 109-118.

**Tsuji H, Meguro N, Suzuki Y, Tsutsumi N, Hirai A, and Nakazono M** (2003) Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during re-aeration in rice. *FEBS Letters* **546**(2-3): 369-373.

**van Dongen JT, Fröhlich A, Ramírez-Aguilar SJ, Schauer N, Fernie AR, Erban A, Kopka J, Clark J, Langer A, and Geigenberger P** (2009) Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. *Ann Bot* **103**(2): 269-280.

**van Dongen JT and Licausi F** (2015) Oxygen sensing and signaling. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 345-367.

**van Dongen JT, Schurr U, Pfister M, and Geigenberger P** (2003) Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. *Plant Physiol* **131**(4): 1529-1543.

**Vanlerberghe GC, Horsey AK, Weger HG, and Turpin DH** (1989) Anaerobic Carbon Metabolism by the Tricarboxylic Acid Cycle : Evidence for Partial Oxidative and Reductive Pathways during Dark Ammonium Assimilation. *Plant Physiol* **91**(4): 1551-1557.

**Vashisht D, Hesselink A, Pierik R, Ammerlaan JM, Bailey-Serres J, Visser EJ, Pedersen O, van Zanten M, Vreugdenhil D, Jamar DC, Voesenek LA, and Sasidharan R** (2011) Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytol* **190**(2): 299-310.

**Vicente J, Mendiondo GM, Movahedi M, Peirats-Llobet M, Juan YT, Shen YY, Dambire C, Smart K, Rodriguez PL, Charng YY, Gray JE, and Holdsworth MJ** (2017) The Cys-Arg/N-End Rule Pathway Is a General Sensor of Abiotic Stress in Flowering Plants. *Curr Biol* **27**(20): 3183-3190 e3184.

**Vigeolas H, van Dongen JT, Waldeck P, Hühn D, and Geigenberger P** (2003) Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol* **133**(4): 2048-2060.

**Viola IL, Güttlein LN, and Gonzalez DH** (2013) Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family. *Plant Physiol* **162**(3): 1434-1447.

**Voesenek LACJ and Bailey-Serres J** (2009) Genetics of high-rise rice. *Nature* **460**: 959-960.

**Weits DA, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten HM, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, van Dongen JT, and Licausi F** (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat Commun* **5**: 3425.

**White MD, Klecker M, Hopkinson RJ, Weits DA, Mueller C, Naumann C, O'Neill R, Wickens J, Yang J, Brooks-Bartlett JC, Garman EF, Grossmann TN, Dissmeyer N,**

**and Flashman E** (2017) Plant cysteine oxidases are dioxygenases that directly enable arginyl transferase-catalysed arginylation of N-end rule targets. *Nat Commun* **8**: 14690.

**Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, Asami T, Chen Z, and Yu JQ** (2009) Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol* **150**(2): 801-814.

**Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, and Mackill DJ** (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**: 705.

**Xu Z-S, Xia L-Q, Chen M, Cheng X-G, Zhang R-Y, Li L-C, Zhao Y-X, Lu Y, Ni Z-Y, Liu L, Qiu Z-G, and Ma Y-Z** (2007) Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance. *Plant Molecular Biology* **65**(6): 719-732.

**Yao Y, He RJ, Xie QL, Zhao XH, Deng XM, He JB, Song L, He J, Marchant A, Chen XY, and Wu AM** (2017) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 74 (ERF74) plays an essential role in controlling a respiratory burst oxidase homolog D (RbohD)-dependent mechanism in response to different stresses in *Arabidopsis*. *New Phytol* **213**(4): 1667-1681.

**Zabalza A, van Dongen JT, Froehlich A, Oliver SN, Faix B, Gupta KJ, Schmäzlin E, Igal M, Orcaray L, Royuela M, and Geigenberger P** (2009) Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiol* **149**(2): 1087-1098.

**Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, and Koch KE** (1998) Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses. *Plant Physiol* **116**(4): 1573-1583.

**Zeng Y, Wu Y, Avigne WT, and Koch KE** (1999) Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. *Plant Physiol* **121**(2): 599-608.

**Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo J, and Ma Y** (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to

salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* **60**(13): 3781-3796.

**Zhang HK, Zhang X, Mao BZ, Li Q, and He ZH** (2004) Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. *Cell Res* **14**(1): 27-33.

**Zhao Y, Wei T, Yin KQ, Chen Z, Gu H, Qu LJ, and Qin G** (2012) Arabidopsis RAP2.2 plays an important role in plant resistance to *Botrytis cinerea* and ethylene responses. *New Phytol* **195**(2): 450-460.

**Zwack PJ, De Clercq I, Howton TC, Hallmark HT, Hurny A, Keshishian EA, Parish AM, Benkova E, Mukhtar MS, Van Breusegem F, and Rashotte AM** (2016) Cytokinin Response Factor 6 Represses Cytokinin-Associated Genes during Oxidative Stress. *Plant Physiol* **172**(2): 1249-1258.

Die Erlaubnis zur Veröffentlichung der Abbildungen 1, 2, 4 und 22 wurde von den jeweiligen Rechteinhabern erteilt.

## Danksagungen

Ich danke Prof. Dr. Peter Geigenberger, der mir dieses spannende Thema zur Promotion anbot und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Ohne seine Betreuung, sein Vertrauen und seine Unterstützung würde ich heute nicht da stehen, wo ich jetzt bin.

Außerdem danke ich meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Joost T. van Dongen und Dr. Romy Schmidt von der RWTH Aachen für die guten Gespräche und Ratschläge zu meiner wissenschaftlichen Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Francesco Licausi für die Bereitstellung der Pflanzenlinien, Prof. Dr. Dario Leister für die Bereitstellung der Antikörper und Prof. Dr. Margret Sauter für ihre wertvollen Ideen. Außerdem danke ich Dr. Martin Lehmann und Jennifer Lindstadt für die Durchführung der GC-TOF-MS Analyse und die Hilfe bei deren Evaluierung.

Ein besonderer Dank gilt allen früheren und derzeitigen Kollegen in der AG Geigenberger. Neben langen fachlichen Diskussionen im Büro und selbstverständlicher Hilfsbereitschaft im Labor werden mir unsere gemeinsamen Unternehmungen immer in Erinnerung bleiben. Ob wir uns durch den Olympiapark oder auf Berge quälten, auf der Wiesen oder auf Christkindmärkten feierten, oder „nur“ zum Grillen oder Eis essen zusammen saßen, es war immer schön mit Euch! Speziell bedanken möchte ich mich dabei bei Dr. Ina Thormählen, Dr. Benjamin Faix und Dr. Martin Gänsheimer, von denen ich viel lernen konnte, sowie bei Anne Bierling, die mich bei meinen Experimenten oft unterstützte.

Außerdem danke ich den Studenten, die mich während ihrer Bachelor- oder Masterarbeit, ihres Forschungspraktikums oder als wissenschaftliche Hilfskraft unterstützten und von denen ich ausgewählte Ergebnisse in die vorliegende Arbeit aufnehmen konnte: Carmen Amerhauser, Dejan Dziubek, Simon Bergler und Srignanakshi Iyer. Doch auch die Studenten, deren Ergebnisse thematisch nicht einfließen konnten, waren mir eine wertvolle Hilfe: Antonia Schwab, Sean Christopher Jakubke, Sarah Zinn, Valentin Hankofer und Zarah Meisen. Vielen Dank an Euch!

Darüber hinaus danke ich dem Gewächshaus-Team für ihre tolle und zuverlässige Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem Dr. Peter Anton Hagl für die kleinen erbauenden Gespräche zwischendurch.

Zu guter Letzt danke ich meinen Liebsten um mich herum, meiner Familie und meinen Freunden, da sie mich immer unterstützt und ermutigt haben, auch wenn es gerade stressig war. Ganz besonders gilt dies für meine Mutter, meine Schwester und meinen Partner, auf die ich mich immer verlassen kann.

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name Melanie Verena Paul  
Geburtsdatum 11.11.1988  
Geburtsort München  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### Schulische und akademische Ausbildung

seit 01/2014 Ludwig-Maximilians-Universität München  
Department Biologie I - Pflanzenmetabolismus  
Promotion zum Thema „Die Regulierung des Pflanzenmetabolismus unter verringerten Sauerstoffkonzentrationen“

10/2011 - 09/2013 Ludwig-Maximilians-Universität München  
Studium: Master of Biology  
Thema der Masterarbeit: „Untersuchungen zur Bedeutung von Thioredoxinen und Thioredoxin-Reduktasen in *Arabidopsis thaliana*“

10/2008 - 07/2011 Ludwig-Maximilians-Universität München  
Studium: Bachelor in Biologie  
Thema der Bachelorarbeit: „Der Einfluss von Zuckern auf die Stärkesynthese in *Arabidopsis thaliana*“

09/1999 - 06/2008 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Publikationen

**Schmidt RR, Fulda M, Paul MV, Anders M, Plum F, Weits DA, Kosmacz M, Larson TR, Graham IA, Beemster GTS, Licausi F, Geigenberger P, Schippers JH, and van Dongen JT** (2018) Low-oxygen response is triggered by an ATP-dependent shift in oleoyl-CoA in *Arabidopsis*. PNAS [Epub ahead of print] DOI: 10.1073/pnas.1809429115.

**Parvin N, Carrie C, Pabst I, Läufer A, Laha D, Paul MV, Geigenberger P, Heermann R, Jung K, Vothknecht UC, and Chigri F** (2017) TOM9.2 is a calmodulin-binding protein critical for TOM complex assembly but not for mitochondrial protein import in *Arabidopsis thaliana*. Mol Plant **10**(4): 575-589.

**# Paul MV, Iyer S, Amerhauser C, Lehmann M, van Dongen JT, and Geigenberger P** (2016) Oxygen sensing via the ethylene response transcription factor RAP2.12 affects plant metabolism and performance under both normoxia and hypoxia. Plant Physiol **172**(1): 141-153.

# Teile der vorliegenden Arbeit wurden in dieser Publikation veröffentlicht.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde. Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Diese Dissertation wurde weder ganz noch in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 25.09.2018

Melanie Verena Paul