

# **Transkriptionelle Regulation des pflanzlichen Detoxifikationsprogramms durch das GRAS-Protein SCL14**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Alexander Meier

aus Hameln

Göttingen, 2014

## **Betreuungsausschuss**

**Prof. Dr. Christiane Gatz**

(Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

**Prof. Dr. Volker Lipka**

(Abteilung Zellbiologie der Pflanze)

**Dr. Corinna Thurow**

(Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

## **Mitglieder der Prüfungskommission**

Referentin:

**Prof. Dr. Christiane Gatz**

(Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

Koreferent:

**Prof. Dr. Volker Lipka**

(Abteilung Zellbiologie der Pflanze)

## **Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:**

**Prof. Dr. Ivo Feussner** (Abteilung Biochemie der Pflanze)

**Prof. Dr. Andrea Polle** (Abteilung Forstbotanik und Baumphysiologie)

**PD Dr. Thomas Teichmann** (Abteilung Zellbiologie der Pflanze)

**Jun. Prof. Dr. Cynthia Gleason** (JP Molekulare Pflanzenwissenschaften)

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2014

**Erratum:**

Die Analysen des mutierten SCL14 Proteins, in denen die Cysteine in den Positionen C400 und C691 zu Serinen mutiert wurden (Kapitel 4.2.1 bis Kapitel 4.2.3), sind nicht relevant, da nach Abgabe der Arbeit festgestellt wurde, dass das Protein einen zusätzlichen Austausch in einer konservierten Aminosäure (S762F) der GRAS-Domäne enthält. Der beschriebene Funktionsverlust in der C5,9S Doppelmutante könnte daher auf die ungewollte Mutation zurückzuführen sein.



# Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung .....	1
2 Einleitung .....	2
2.1 Das pflanzliche Detoxifikationsprogramm .....	2
2.2 SCL14 gehört zur Familie der GRAS-Transkriptions-faktoren .....	5
2.3 Redox-basierte Proteinmodifikationen und Signal-transduktion .....	9
2.4 Reaktive Elektrophile Spezies .....	14
2.5 Ziel dieser Arbeit .....	17
3 Material und Methoden .....	19
3.1 Material .....	19
3.1.1 Geräte .....	19
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	20
3.1.3 Chemikalien .....	20
3.1.4 Kits .....	21
3.1.5 Enzyme .....	21
3.1.6 Größenstandards .....	22
3.1.7 Antikörper .....	22
3.1.8 Nukleinsäuren .....	22
3.1.8.1 Oligonukleotide .....	22
3.1.8.2 Plasmide .....	24
3.1.9 Organismen .....	27
3.1.9.1 Bakterien .....	27
3.1.9.2 Hefe .....	28
3.1.9.3 Pflanzen .....	28
3.1.10 Nährmedien .....	29
3.1.11 Standardpuffer .....	29
3.2 Methoden .....	30
3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden .....	30
3.2.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	30
3.2.1.2 DNA-Isolation aus <i>A. thumefaciens</i> .....	30
3.2.1.3 DNA-Isolation aus <i>A. thaliana</i> .....	31
3.2.1.4 Polymerase Kettenreaktion .....	31
3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	33
3.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	33
3.2.1.7 Restriktionsspaltung von DNA .....	33
3.2.1.8 Ligation von DNA-Molekülen .....	34
3.2.1.9 Dephosphorylierung von DNA .....	34
3.2.1.10 Gateway <sup>®</sup> -Klonierung .....	35
3.2.1.11 Sequenzierung von DNA .....	35
3.2.1.12 Transformation von <i>E. coli</i> .....	35
3.2.1.13 Transformation von <i>A. thumefaciens</i> .....	35
3.2.1.14 Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> .....	36
3.2.2 Biochemische Standardmethoden .....	36
3.2.2.1 Proteinextraktion aus <i>A. thaliana</i> .....	36
3.2.2.2 Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	36
3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	37
3.2.2.4 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese .....	37
3.2.2.5 Protein Immunoblot .....	38
3.2.3 Pflanzenanzuchtbedingungen .....	38

3.2.3.1 Pflanzenanzucht auf Erde .....	38
3.2.3.2 Sterile Pflanzenanzucht in einem hydroponischen System.....	39
3.2.3.3 Sterile Pflanzenanzucht auf mit Nährmedium beschichteten Objektträgern und Schrägagarplatten .....	39
3.2.4 Oberflächensterilisation von Samen .....	39
3.2.5 Transkriptomanalyse .....	40
3.2.5.1 RNA Extraktion .....	40
3.2.5.2 Synthese von cDNA .....	40
3.2.5.3 Quantitative Echtzeit PCR (qRT – PCR) .....	41
3.2.5.4 Microarrayanalyse.....	42
3.2.6 Behandlung von <i>A. thaliana</i> mit Chemikalien .....	43
3.2.6.1 Chemikalienbehandlung im hydroponischen System.....	43
3.2.6.2 Chemikalienbehandlung auf mit Nährmedium beschichteten Objektträgern .....	43
3.2.6.3 Behandlung von auf Erde angezogenen Pflanzen mit TIBA .....	45
3.2.7 Transiente Luciferase Reporterassays in Protoplasten .....	45
3.2.7.1 Protoplastierung von <i>A. thaliana</i> Blattgewebe.....	45
3.2.7.2 Transiente Transformation von <i>A. thaliana</i> Protoplasten .....	46
3.2.7.3 Luciferase Reporterassay .....	46
3.2.7.4 Für die Protoplastierung und Transformation genutzte Puffer.....	47
3.2.8 Hefe – Zwei – Hybrid – System .....	48
3.2.8.1 Transformation von Hefezellen .....	49
3.2.8.2 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Hefeextrakten (oNPG- Test).....	49
3.2.9 Markierung von cysteinhaltigen Proteinen mit mPEG-Mal-5000.....	50
3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie.....	52
3.2.11 Bestimmung von Wurzellängen .....	52
4 Ergebnisse.....	53
4.1 Chemischer Stress induziert die Akkumulation von SCL14 in Zellkernen von <i>A. thaliana</i> Wurzelzellen.....	53
4.1.1 Die Inhibition des Kernexports führt zur Akkumulation von SCL14 im Zellkern von <i>Arabidopsis</i> Wurzelzellen.....	53
4.1.2 SCL14 akkumuliert im Zellkern nach der Behandlung von <i>Arabidopsis</i> Wurzeln mit Salicylsäure, 2,3,5-Triiodo-benzoessäure und 12-oxo-Phytodiensäure .....	56
4.1.3 Die Stickstoffmonooxidendonatoren Natriumnitroprussid und S-Nitrosoglutathion induzieren nicht die Akkumulation von SCL14 im Zellkern. 60	
4.1.4 NaCl und CdCl <sub>2</sub> induzieren nicht die Akkumulation von SCL14 im Zellkern .....	62
4.1.5 Die Akkumulation von SCL14 im Zellkern ist 30 Minuten nach Beginn des Stimulus abgeschlossen.....	64
4.1.6 Die Akkumulation von SCL14 im Zellkern ist unabhängig von den TGA- Transkriptionsfaktoren der Klasse II .....	65
4.2 Cysteine spielen eine Rolle für die Aktivität von SCL14.....	67
4.2.1 Die Cysteine C400 und C691 sind notwendig für die transkriptionsaktivierende Funktion von SCL14 .....	67
4.2.2 Die Cysteine 400 (C5) und 691 (C9) sind essentiell für die Interaktion von SCL14 mit TGA2 und XPO1a .....	72
4.2.3 Die Cysteine C400 und C691 sind innerhalb der nächsten Verwandten von SCL14 konserviert .....	73

4.2.4 Die Cysteine in der GRAS-Domäne von SCL14 sind notwendig für die Akkumulation des Proteins im Zellkern.....	74
4.3 Analyse und Identifikation von SCL14 Zielgenen in Wurzeln von <i>Arabidopsis thaliana</i> nach chemischem Stress .....	76
4.3.1 Die Aktivierung des SCL14 Zielgenes <i>GSTU7</i> erfolgt in Wurzeln von <i>Arabidopsis</i> durch SA und TIBA .....	76
4.3.2 Microarray-Analyse der Expression von SCL14 Zielgenen in Wurzeln nach Behandlung mit SA .....	78
4.3.3 Einfluss der Deletion von <i>SCL14</i> und <i>SCL33</i> auf die Genexpression .....	85
4.3.4 SA und TIBA induzieren die Expression von SCL14 Zielgenen in Wurzeln von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	87
4.3.5 Jasmonsäure induziert die Expression von <i>GSTU7</i> .....	88
4.3.6 Die Expression von <i>GSTU7</i> , <i>UGT73B3</i> , <i>AT3G04130</i> und <i>AT5G61800</i> ist abhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II.....	89
4.3.7 Das GFP-SCL14 Fusionsprotein komplementiert den Phänotyp der <i>scl14/33</i> Mutante .....	90
4.3.8 SCL14 akkumuliert auch im hydroponischen System nach SA Behandlung im Zellkern.....	92
4.4 SCL14 scheint nach der Behandlung von <i>Arabidopsis</i> Wurzeln mit SA oxidiert zu werden.....	93
4.5 Suche nach Interaktionspartnern von SCL14 mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	95
4.5.1 AtNAC017 interagiert mit der GRAS-Domäne von SCL14 .....	95
4.5.2 Charakterisierung einer <i>NAC017</i> T-DNA Insertionslinie .....	100
4.5.3 Expression von SCL14 Zielgenen in der <i>nac017</i> Mutante .....	102
5 Diskussion .....	104
5.1 Unterschiedliche Substanzen führen zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern .....	105
5.2 Die Cysteine C400 und C691 sind essentiell für die Funktionalität von SCL14 .....	110
5.3 SA induziert Gene der Stressantwort in Wurzeln von <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	117
5.4 SCL14 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor NAC017.....	119
6 Anhang .....	122
7 Literaturverzeichnis .....	177
8 Abkürzungsverzeichnis.....	189
9 Danksagung .....	191
10 Lebenslauf .....	193

# **1 Zusammenfassung**

In Pflanzen wird durch den Kontakt mit toxischen Substanzen eine Gruppe von Genen aktiviert, die in die Detoxifikation dieser Substanzen involviert sind. Ein Teil dieser Gene wird durch den Transkriptionskoaktivator Scarecrow-like 14 (SCL14) aus der Familie der GRAS-Transkriptionsfaktoren reguliert. SCL14 interagiert mit den redundanten bZIP Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6. Der SCL14/TGA Komplex bindet an *as-1-ähnliche* Elemente in den Promotoren der Zielgene von SCL14.

In dieser Arbeit konnte mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass sich die intrazelluläre Lokalisation von SCL14 in Wurzelzellen von *Arabidopsis thaliana* nach der Einwirkung des Phytohormons Salicylsäure (SA), des Xenobiotikums 2,3,5-Triiodobenzoessäure (TIBA) und des Oxilipins 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) ändert. In der unbehandelten Wurzelzelle ist das Protein gleichmäßig zwischen Cytosol und Kern verteilt, nach der Behandlung der Wurzel mit den genannten Substanzen kommt es zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern. Da es sich bei SA, TIBA und OPDA um elektrophile Substanzen handelt, könnte der auslösende Stimulus für die Akkumulation von SCL14 im Zellkern oxidativer Stress sein. Da die Mutation von zwei Cysteinen zu Serinen in der GRAS-Domäne von SCL14 zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Proteins führt, könnten die kritischen Cysteine Ziele von Redoxmodifikationen sein.

Transkriptomanalysen von unbehandelten und SA-behandelten Wurzeln von Wildtyp- und *sc/14/33* Pflanzen zeigten, dass SCL14 bei manchen Genen spezifisch die SA-Induktion, nicht aber die Basalexpression beeinflusst. Hier scheint die Kernakkumulation eine wichtige Rolle zu spielen. Bei einer zweiten Gruppe wirkt SCL14 als ein konstitutiver Verstärker sowohl der basalen als auch der SA-induzierten Expression.

In einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment wurde der Transkriptionsfaktor NAC017 als neuer Interaktionspartner von SCL14 identifiziert. Allerdings war die Expression der Zielgene von SCL14 in der *nac017 knockout* Mutante nach der Behandlung mit SA ähnlich zum Wildtyp. Die Interaktion von SCL14 mit NAC017 spielt daher entweder keine Rolle für die Expression der untersuchten Gene, oder ein weiterer NAC Transkriptionsfaktor kann die Aufgaben von NAC017 in der Mutante übernehmen.



## **2 Einleitung**

Als sessile Organismen haben Pflanzen nicht die Möglichkeit, ungünstigen Umweltbedingungen auszuweichen. Aus diesem Grund haben sie eine breite Palette von Strategien entwickelt, um schädliche Einflüsse, sowohl biotischen als auch abiotischen Ursprungs, zu überdauern. Physikalische Barrieren wie Trichome und die Kutikula gegen abiotische Stressfaktoren, wie starke Sonneneinstrahlung und Trockenheit, sowie Dornen, die Zellwand und wiederum Trichome gegen biotische Stressfaktoren wie Fraßfeinde und Pathogene bilden einen ersten Verteidigungsmechanismus. Hinzu kommen in geringer Menge produzierte Chemikalien als zusätzlicher Schutz gegen Pathogene und Herbivoren.

Zusätzlich verfügt die Pflanze über induzierbare Mechanismen, sowohl zur Abwehr von Pathogenen als auch zur Entgiftung toxischer Substanzen.

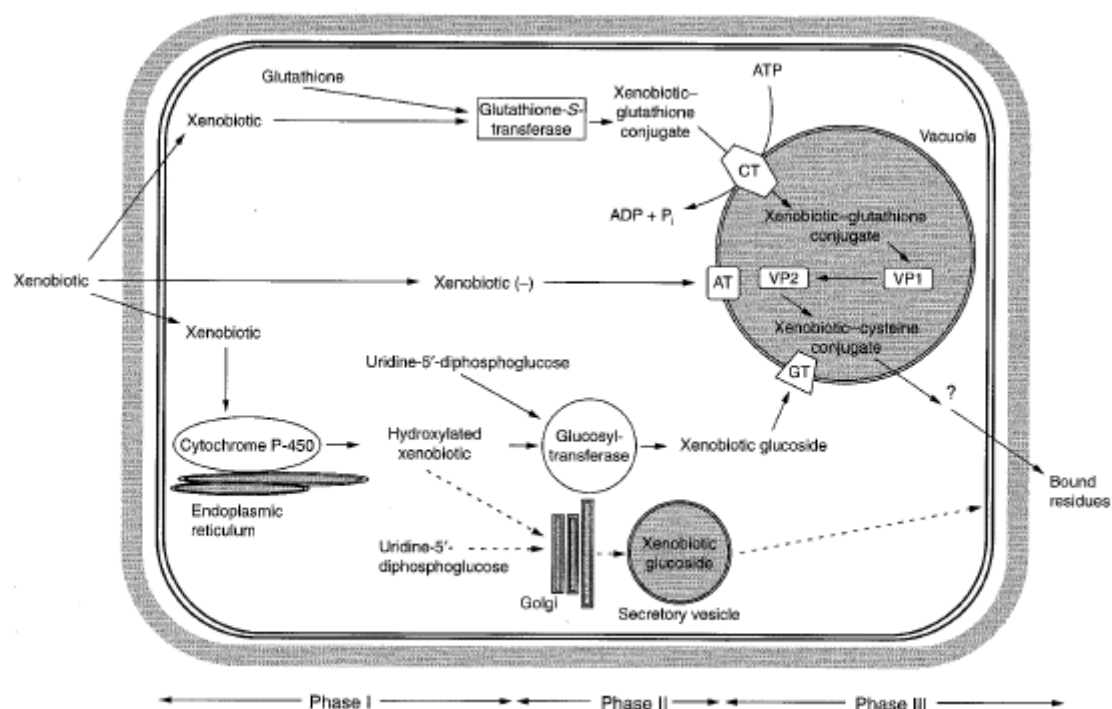
### **2.1 Das pflanzliche Detoxifikationsprogramm**

Pflanzen werden während ihres Lebenszyklus mit zahlreichen toxischen Substanzen konfrontiert. Hierbei kann es sich um von Pathogenen synthetisierte Toxine handeln, aber auch um von anderen Pflanzen im Wettbewerb um Lebensraum und Ressourcen abgesonderte Substanzen, die sogenannten Allelochemikalien. Hinzu kommen Toxine menschlichen Ursprungs in Form von Herbiziden oder Umweltgiften (Coleman et al. 1997). Die Detoxifikation dieser Xenobiotika kann in drei durch Enzyme katalysierte Stufen unterteilt werden: eine Aktivierungsstufe, eine Konjugationsstufe und eine Kompartimentierungsstufe (Sandermann 1992). In der Aktivierungsstufe erfolgt das Einfügen oder Freilegen einer reaktiven Gruppe. Ein Großteil dieser Aktivierungsreaktionen wird durch die Aktivität von Cytochrom P450 Monooxygenasen vermittelt (Ekman et al. 2003; Bolwell et al. 1994). Aufgrund des Einfügens von reaktiven Gruppen sind die Produkte dieser Reaktionen oft ebenso toxisch wie die Ausgangssubstanzen oder sogar toxischer (Baerson et al. 2005). In der Konjugationsstufe erfolgt die kovalente Modifikation der aktivierten Substanzen mit einem hydrophilen Molekül, wie Glutathion durch Glutathion S-Transferasen (Armstrong 1991; Dixon et al. 1998) oder Glukose, durch Glykosyltransferasen (Coleman et al. 1997). Diese Modifikation führt zur Inaktivierung der Toxine und erhöht ihre Hydrophilie, wodurch sie nicht mehr durch Membranen diffundieren

können. Dies ist eine Voraussetzung für die dritte Stufe der Detoxifikation. In dieser Stufe erfolgt der aktive Transport der Konjugate in die Vakuole oder den apoplastischen Raum durch ATP-Bindekassetten-Transporter (ABC-Transporter) (Martinoia et al. 2001; Li et al. 2002). In der Vakuole erfolgt teilweise ein Abbau der eingelagerten Substanzen (Grzam et al. 2007) während im apoplastischen Raum eine Integration in die Zellwand erfolgen kann (Sandermann et al. 1984).

Die an den Detoxifikationsmechanismen beteiligten Gene werden durch die Einwirkung von Xenobiotika auf die Pflanze induziert. Zumindest ein Teil dieser Gene, die in die Detoxifikation von Xenobiotika involviert sind, werden in Abhängigkeit von bZIP-Transkriptionsfaktoren aus der Familie der TGA-Transkriptionsfaktoren exprimiert. So wurden durch Phytoprostane in Arabidopsis Detoxifikationsgene aktiviert und die Expression von 60% dieser Gene war in der *tga256* Mutante, in der die drei TGA-Faktoren der Klasse II deletiert sind, reduziert (Mueller et al. 2008). Weiterhin konnte in den Promotoren von Genen, die durch die Allelochemikalie Benzoxazolin-2(3*H*)-on (BOA) induziert wurden, eine Anreicherung von TGA-Bindemotiven festgestellt werden (Baerson et al. 2005). Die TGA-Faktoren binden an das *as-1* Element (Katagiri et al. 1992), welches zuerst als funktionelles *cis* Element des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus identifiziert wurde (Benfey et al. 1989). Es besteht aus zwei imperfekten Wiederholungen der Sequenz TGACGTCA, deren palindromische Zentren 12 Basenpaare voneinander entfernt liegen (Qin et al. 1994; Krawczyk et al. 2002). Die Aktivierung des *as-1* Elements erfolgt unter anderem durch Salicylsäure (SA), Auxin, das Auxin Analogon und Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und oxidativen Stress (Liu & Lam 1994; Zhang & Singh 1994; Uquillas et al. 2004; Garretón et al. 2002). Die Aktivierung des *as-1* Elementes durch TGA-Faktoren erfolgt unter Zusammenwirkung mit weiteren Transkriptionskofaktoren. So ist für die SA-abhängige Aktivierung des Gens *Pathogenesis Related 1* (*PR1*) die Anwesenheit des Proteins NONEXPRESSOR OF PR1 (*NPR1*) und dessen Interaktion mit TGA-Faktoren nötig (Després et al. 2003; Zhou et al. 2000; Fan & Dong 2002). Die Aktivierung des *as-1* Elementes durch oxidativen Stress ist unabhängig von *NPR1*, nicht jedoch von TGA-Faktoren (Uquillas et al. 2004). Fode et al. konnten zeigen, dass der TGA-Faktor TGA2 mit dem GRAS-Protein SCARECROW-LIKE 14 (*SCL14*) interagiert und dass diese Interaktion für die Aktivierung einer Gruppe von Genen notwendig ist, die potentiell an pflanzlichen Entgiftungsmechanismen beteiligt sind (Fode et al. 2008).

Die Aktivierung der Gene, unter anderem eine Glutathion S-Transferase (*GSTU7*) und eine Cytochrom P450 Monooxygenase (*CYP81D11*), erfolgte SCL14-abhängig durch das Xenobiotikum 2,3,5-Triiodobenzoessäure (TIBA) und 2,4-D. Des Weiteren konnte durch Fode et al. gezeigt werden, dass *sc14 knockout* Mutanten auf Nährmedium, welches TIBA enthielt, ein reduziertes Keimlingswachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigten, während eine Überexpressionslinie von SCL14 weniger empfindlich gegenüber der Chemikalie war. SCL14 scheint also an der Regulation von Teilen des pflanzlichen Detoxifikationsprogrammes beteiligt zu sein.



**Abbildung 2.1: Die Detoxifikation xenobiotischer Substanzen in Pflanzen**

Die enzymkatalysierten Reaktionen im Verlauf der Detoxifikation xenobiotischer Substanzen sind in unterschiedlichen Organellen und zellulären Kompartimenten lokalisiert. Die gestrichelten Pfeile stellen einen möglichen Weg für die Glycosylierung von Xenobiotika im Golgiapparat, gefolgt von der Ablagerung der Metabolite im apoplastischen Raum durch Exocytose, dar.

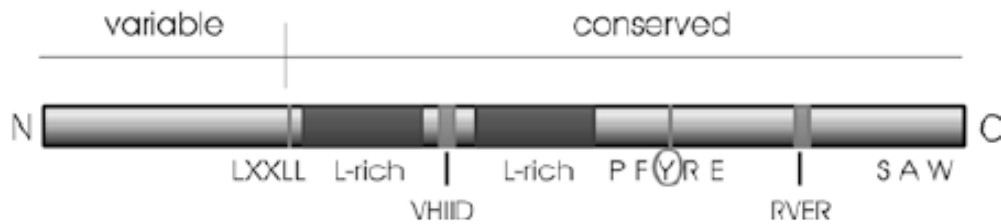
Abkürzungen: CT: Glutathionkonjugat Transporter; AT: ATP-abhängiger Transporter für xenobiotische Anionen; GT: ATP-abhängiger Glucosidkonjugat Transporter; VP: vakuoläre Peptidase. (Coleman et al. 1997)

Die Wahrnehmung der xenobiotischen Substanzen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Da es sich bei Xenobiotika um reaktive Moleküle handelt, können diese direkt Sensormoleküle kovalent modifizieren. Anstatt einer kovalenten Modifikation kann die Erkennung der Xenobiotika durch die Sensormoleküle auch im Sinne der Erkennung eines Rezeptors erfolgen, wie es bei Säugetieren beispielsweise durch die Arylhydrocarbonrezeptoren geschieht (Ramel et al. 2012). Die Wahrnehmung der

Xenobiotika kann jedoch auch über die Detektion sekundärer Stoffe, die aufgrund der schädigenden Wirkung in der Zelle entstehen, geschehen. Bei diesen sekundären Substanzen handelt es sich zumeist ebenfalls um Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder reaktive elektrophile Spezies (RES) wie beispielsweise Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) oder Lipidperoxide.

## **2.2 SCL14 gehört zur Familie der GRAS-Transkriptionsfaktoren**

Die Familie der GRAS-Transkriptionsfaktoren wurde zum ersten Mal von Pysh et al. 1999 beschrieben (Pysh et al. 1999) und nach den drei zuerst entdeckten Mitgliedern GIBBERELLIN-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF *Ga1-3* (RGA) und SCARECROW (SCR) benannt (Peng et al. 1997; Silverstone et al. 1998; Di Lorenzo et al. 1996). Neben *Arabidopsis thaliana* wurden auch in weiteren Pflanzenspezies GRAS-Proteine gefunden. Unter anderem in Reis, Mais, Gerste, Erbse und Moosen (Pysh et al. 1999; Bolle 2004; Tian et al. 2004; Sassa et al. 2001; Nishiyama et al. 2003). Die GRAS-Proteine sind durch einen konservierten C-Terminus, die GRAS-Domäne, charakterisiert, während der N-Terminus sehr variabel ist. Lediglich innerhalb von Unterfamilien ist auch der N-Terminus konserviert (Sun et al. 2012). Die GRAS-Domäne umfasst mehrere konservierte Motive (Abb. 2.2). Das VHIID Motiv, welches in allen Mitgliedern der GRAS-Familie vorhanden und von zwei Leucin reichen Sequenzen umgeben ist, sowie die PFYRE-, RVER- und SAW-Motive. Die Benennung dieser Motive erfolgte nach den darin konservierten Aminosäuren (Bolle 2004). Einige GRAS-Proteine weisen in ihrer GRAS-Domäne außerdem ein LXXLL-Motiv auf (Bolle 2004). Dieses Motiv vermittelt in Säugertieren die Bindung von Steroidrezeptor Koaktivator Komplexen an ihre Kernrezeptoren (Heery et al. 1997). In *Arabidopsis thaliana* ist dieses Motiv essentiell für die Interaktion von Glutaredoxinen des CC-Typs mit TGA-Transkriptionsfaktoren (Li et al. 2011).



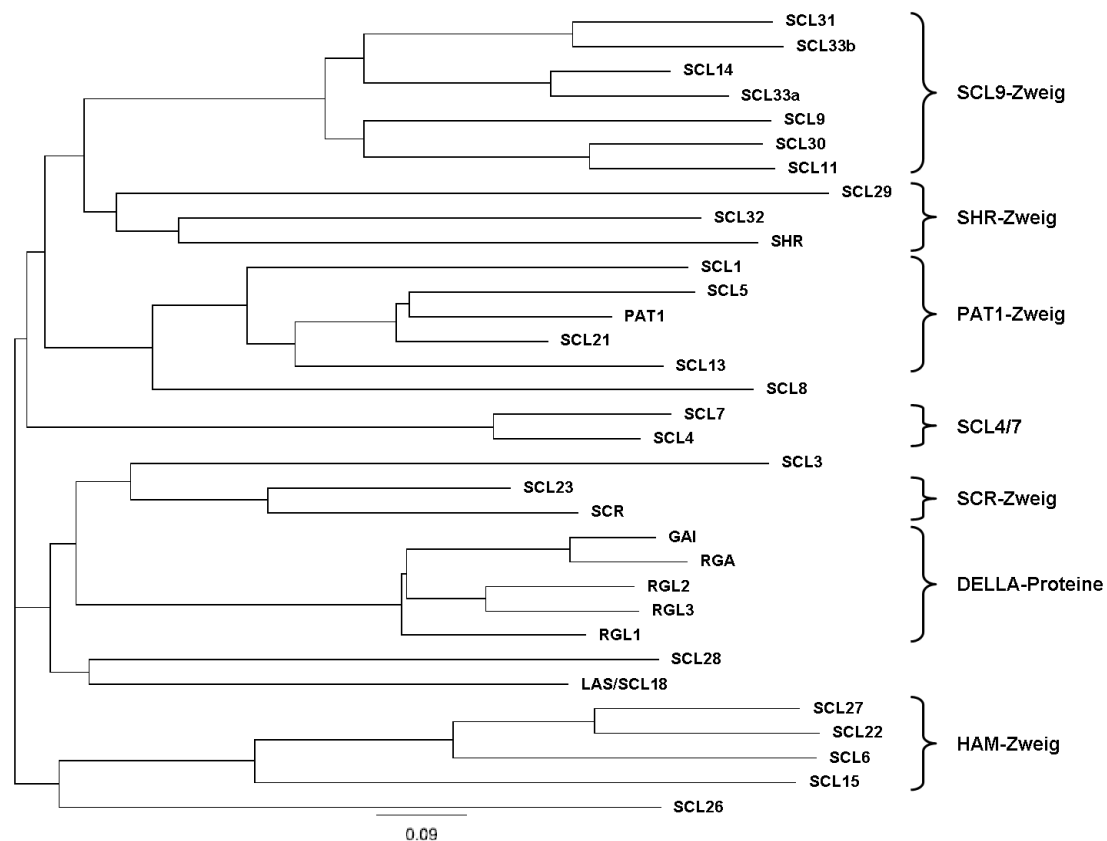
**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der GRAS-Proteine.** (Bolle 2004)

Aufgrund der Homologie der Domänenstruktur wurden die GRAS-Proteine mit der Proteinfamilie *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) in Verbindung gebracht. Die STAT-Proteine sind eine Familie von Signalübertragungsproteinen in der Gruppe der Metazoa, die den Effekt von extrazellulären Signalmolekülen auf die Genexpression vermitteln. Ausgelöst durch die Bindung eines Signalmoleküls an einen extrazellulären Rezeptor werden die STAT-Proteine an einem Tyrosinrest phosphoryliert, was zur Dimerisierung und zum Transport in den Zellkern und somit zur Aktivierung der Genexpression führt (Richards et al. 2000). Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass die pflanzlichen GRAS-Proteine eher mit bakteriellen GRAS-Proteinen als mit der STAT-Proteinfamilie verwandt sind, bei denen es sich um Methyltransferasen handelt. Zwar haben die meisten der pflanzlichen GRAS-Proteine die für die Methyltransferaseaktivität notwendigen Aminosäuren verloren, jedoch nicht diejenigen, die für die Substratbindung notwendig sind. Daher wird eine Funktion der GRAS-Proteine bei der Bindung von kleinen Molekülen, speziell von Gibberellinen oder deren biologisch inaktiven Methylestern, postuliert (Zhang et al. 2012).

GRAS-Proteine sind an zahlreichen Prozessen, wie der Organisation von Meristemen und der Wurzelarchitektur, der Regulation des Sprosswachstums, der hormonellen Signalübertragung und der Stressantwort beteiligt. Beispielsweise verursacht das Fehlen des GRAS-Proteins SCARECROW (SCR) eine Verschmelzung des Wurzelcortex und der Endodermis (Di Laurenzio et al. 1996). Außerdem ist SCR ebenfalls notwendig für die normale Entwicklung von oberirdischen Pflanzenteilen. Unter anderem fehlt *scr* Mutanten die Stärkescheide, die für die Perzeption des Schwerkraftreizes notwendig ist (Fukaki et al. 1998; Wysocka-Diller et al. 2000). SCR wird ebenfalls im Ruhenden Zentrum von Apikalmeristemen exprimiert und ist dort für die Erhaltung des Stammzellstatus notwendig (Sabatini et al. 2003). Ein weiteres GRAS-Protein, welches für die normale Entwicklung der Architektur von Wurzel und Spross erforderlich ist, ist SHORTROOT

(SHR). SHR ist ein positiver Regulator von SCR und wirkt mit diesem zusammen bei der Differenzierung der Gewebe (Helariutta et al. 2000; Nakajima et al. 2001).

Das GRAS-Protein LATERAL SUPPRESSOR (LS) aus Tomate ist wichtig für die Initialisierung von Lateralmeristemen im Spross. Mutanten, denen dieses Protein fehlt, weisen einen Defekt in der Bildung von Seitensprossen, eine geringere Blütenzahl pro Blütenstand, eine reduzierte Fruchtbarkeit sowie veränderte Hormonspiegel auf und bilden keine Kronblätter. Für das Homolog in Arabidopsis, SCL18, konnte ebenfalls eine Beteiligung an der Seitensprossbildung nachgewiesen werden und das Homolog in Reis *OsMOC1*, ist wichtig für die Bildung von Ausläufern (Schumacher et al. 1999; Greb et al. 2003; Li et al. 2003). Das *Arabidopsis* GRAS-Protein PAT1 ist in den Phytochrom A Signalweg involviert, da die *pat1-1* Mutante veränderte Reaktionen auf dunkelrotes Licht zeigt. So ist die Expression der durch dunkelrotes Licht induzierten Chalcon Synthase (*CHS*) und des Chlorophyll a/b-Bindeproteins reduziert und das Hypokotylwachstum in dunkelrotem Licht ist verstärkt, was dem Phänotyp der *phyA* Mutante entspricht, der der Rezeptor für dunkelrotes Licht fehlt (Bolle et al. 2000). Die DELLA-Unterfamilie der GRAS-Proteine stellt mit Gibberellin-insensitive (GAI), Repressor of *ga1-3* (RGA) und RGA-like (RGL) 1-3 wichtige Regulatoren des Gibberellin Signalweges. Die DELLA Proteine wirken als Repressoren der durch Gibberellin aktivierten Gene. Diese Repression wird durch Gibberellin aufgehoben und es konnte für einige der DELLA-Proteine gezeigt werden, dass sie nach Gibberellineinwirkung abgebaut werden (Peng et al. 1997; Silverstone et al. 1998; Lee et al. 2002; Wen & Chang 2002; Dill et al. 2001; Silverstone et al. 2001). An der Antwort auf toxischen Stress ist das GRAS-Protein SCARECROW-like 14 (SCL14) beteiligt. SCL14 Zielgene, zu denen Cytochrom P450 Monooxygenasen und Glutathion S-Transferasen gehören und die Teil des pflanzlichen Detoxifikationsprogrammes sind, werden durch Salicylsäure, aber auch durch das Xenobiotikum TIBA und das Herbizid 2,4-D induziert (Fode et al. 2008). SCL14 gehört innerhalb der GRAS-Familie zur SCL9 Unterfamilie, zu der auch SCL9, SCL11, SCL30, SCL31 und SCL33 gehören. Die nächsten verwandten von SCL14 sind SCL31 und SCL33 (Abb. 2.3)



**Abbildung 2.3: Stammbaum der GRAS-Genfamilie**

Die GRAS-Genfamilie kann in sieben Unterfamilien eingeteilt werden und enthält einige Mitglieder, die in keine der Unterfamilien eingeordnet werden können. SCL14 gehört der SCL9-Unterfamilie an. Der Stammbaum wurde mit dem Programm Geneious erstellt (Cost Matrix: Blosum 62; Gap open penalty: 12; Gap extension penalty: 3; Global Alignment; Genetic Distance Model: Jukes-Cantor; Tree build method: Neighbour-Joining), die Benennung der Unterfamilien erfolgte nach Bolle 2004 (Bolle 2004).

Trotz ihrer Funktion als Regulatoren der Transkription konnte für die meisten GRAS-Proteine keine direkte Bindung an DNA nachgewiesen werden (Bolle 2004), für das GRAS-Protein SCL27 wurde diese DNA-Bindung aber inzwischen gezeigt. SCL27 ist an der Regulation der Chlorophyllsynthese im Licht beteiligt und inhibiert diese durch die Bindung an *cis*-Elemente im Promotor der *Protochlorophyllid Oxidoreductase C* (*PORC*) mit der Sequenz G(A/G)(A/T)AA(A/T)GT, was zur Repression des Gens führt. Die Inhibition wird aufgehoben durch die Interaktion von SCL27 mit DELLA-Proteinen, wodurch die DNA-Bindfähigkeit von SCL27 reduziert wird (Ma et al. 2014). SCL14 bindet ebenfalls nicht direkt an die Promotoren seiner Zielgene, sondern wird durch die Interaktion mit TGA2 dorthin rekrutiert. Fode et al. konnten durch Chromatin Immunopräzipitationsexperimente zeigen, dass sich der Komplex aus TGA2 und SCL14 sowohl im uninduzierten Zustand als auch im induzierten Zustand an den Promotoren seiner Zielgene befindet. Die Promotorbindung stellt daher nicht den Mechanismus zur Aktivierung dieser Gene dar. In transient mit einem SCL14-GFP-Fusionsprotein transformierten Tabakprotoplasten ist das GFP-Signal

sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma zu beobachten. Nach der Behandlung der Protoplasten mit dem Kernexportinhibitor Leptomycin B findet sich SCL14 nur noch im Zellkern (Fode et al. 2008), was auf einen ständigen Austausch des Proteins zwischen Zellkern und Cytoplasma schließen lässt. Möglicherweise findet der Schritt zur Aktivierung von SCL14 im Cytoplasma statt und das aktive Protein wird dann in den Zellkern transportiert.

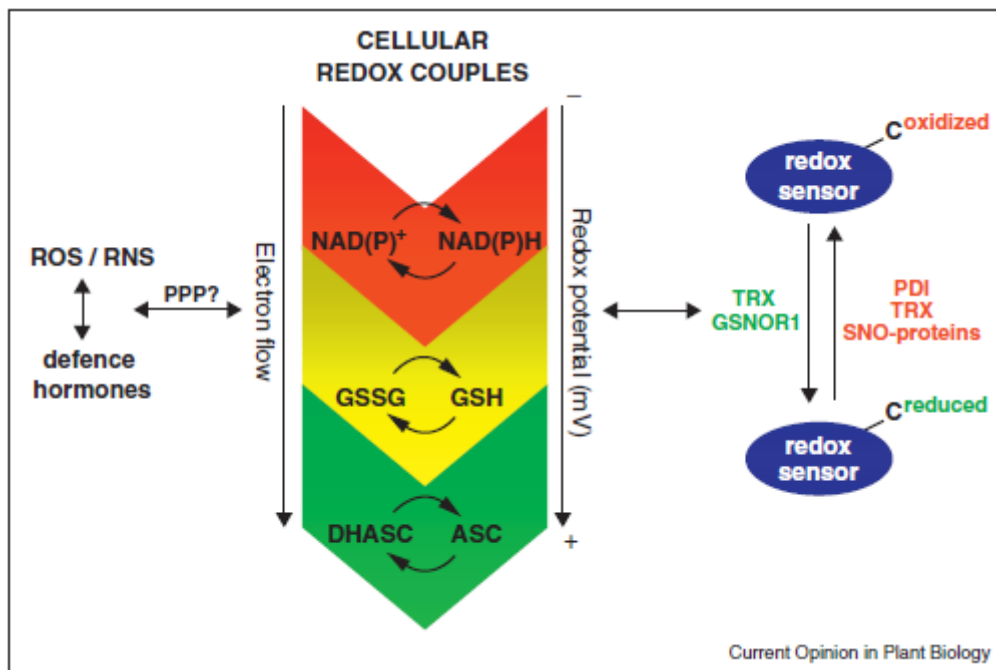
## **2.3 Redox-basierte Proteinmodifikationen und Signaltransduktion**

Durch eine Vielzahl von Stoffwechselreaktionen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) produziert. Dies geschieht einerseits als unerwünschte Beiprodukte, beispielsweise während der Photosynthese und der Zellatmung, andererseits werden ROS und RNS wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) als Signalmoleküle nach Pathogenbefall durch Mitglieder der *Respiratory burst oxidase homolog*-Familie (*Rboh*) bzw. Stickstoffmonoxid Synthasen (NOS) und Nitratreduktasen (NR) produziert (Torres & Dangl 2005; Modolo et al. 2005). Weiterhin lösen Xenobiotika die Entstehung von ROS in der Zelle aus (Ramel et al. 2012)

Die Kontrolle der ROS und RNS und die Weiterleitung des Signals zu Redox Sensor Proteinen erfolgt hauptsächlich durch die drei Redox Paare  $NAD(P)^+/NAD(P)H$ , Glutathion/Glutathiondisulfid (GSH/GSSG) und Ascorbat/Dehydroascorbat (ASC/DHASC) (Noctor 2006). Durch das ansteigende Redox-Potential dieser Redox-Paare, kommt es zu einem Elektronenfluss von  $NAD(P)H$  über Glutathion zu Ascorbat. Die Dehydroascorbat Reduktase reduziert Dehydroascorbat zu Ascorbat unter Verwendung von Glutathion als Reduktionsäquivalent. Die Regeneration des Glutathions erfolgt durch Thioredoxine und Glutathionreduktasen. Im Verlauf dieser Regeneration wird  $NAD(P)H$  zu  $NAD(P)^+$  oxidiert (Noctor 2006). Eine durch ROS/RNS hervorgerufene Veränderung im Verhältnis der Redox-Partner wird durch Redox-Sensorproteine erkannt und führt so zu einer Änderung der Genexpression (Abb. 2.4) (Spoel & Loake 2011). Beispiele für solche Sensormoleküle, deren Aktivität durch Redoxmodifikationen von Cysteinen reguliert wird, sind NPR1, das



SALICYLSÄUREBINDEPROTEIN 3 (SABP3) und die GLUTATHIONE PEROXIDASE 3 (GPX3) (Tada et al. 2008; Y.-Q. Wang et al. 2009; Miao et al. 2006)



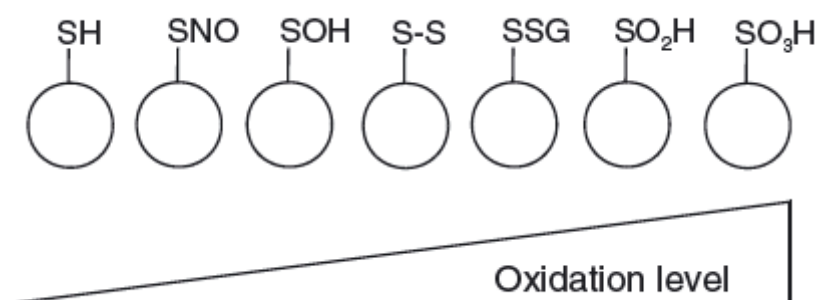
**Abbildung 2.4: Modell der Signalvermittlung von Abwehrhormonen zu Redox-Sensor Proteinen über Redox-Paare kleiner Moleküle.**

Ausgelöst durch Pathogeninfektion induzieren Abwehrhormone die Produktion von ROS und RNS und umgekehrt. Diese Änderungen in der Konzentration von Hormonen und reaktiven Molekülen werden durch die zellulären Redox-Paare  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$ ,  $\text{GSH/GSSG}$  und  $\text{ASC/DHASC}$  detektiert. Das Bindeglied zwischen den Hormonen und reaktiven Molekülen auf der einen und den Redox-Paaren auf der anderen Seite, ist vermutlich der Pentosephosphatweg (PPP). Das ansteigende Redox-Potential der Redox-Paare sorgt für einen Elektronenfluss von  $\text{NAD(P)H}$  über Glutathion zu Ascorbat. Änderungen im Verhältnis der Partner der einzelnen Redox-Paare zueinander werden durch reaktive Cysteine in Redox-Sensor Proteinen erkannt, welche reversibel zwischen dem reduzierten und dem oxidierten Status umschalten können. Die Reduktion von Redox-Sensor Proteinen wird durch Thioredoxine (TRX) und die S-Nitrosoglutathionreduktase 1 (GSNOR1) vermittelt, die Oxidation erfolgt durch die Proteindisulfid Isomerase (PDI), TRX und SNO-Donorproteine (Spoel & Loake 2011).

Die Wichtigkeit vor allem des Glutathions für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes in der Zelle zeigt sich unter anderem dadurch, dass mehrere Mutanten, die in der Synthese oder der Reduktion von Glutathion beeinträchtigt sind, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress zeigen. In der *Arabidopsis* Mutante *glutathione reductase 1 (gr1)* ist das Verhältnis von GSH zu GSSG in Richtung des GSSG verschoben. Diese Pflanzen weisen eine reduzierte Pufferkapazität gegenüber ROS im Vergleich zum Wildtyp auf (Marty et al. 2009). Eine weitere Mutante, mit der die Bedeutung von Glutathion speziell auch für die Resistenz gegenüber Pathogenen und Fraßinsekten gezeigt werden konnte, ist *pad2*. Diese Mutante exprimiert eine inaktive Form der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase 1 (GSH1). Dieses Enzym ist an der Synthese von Glutathion beteiligt indem es die

Bildung von  $\gamma$ -Glutamylcystein aus Glutaminsäure und Cystein katalysiert. Die *pad2* Mutante akkumuliert nur etwa ein fünftel des Glutathions im Vergleich zum Wildtyp und ist empfindlicher gegenüber der Infektion mit den Pathogenen *Pseudomonas syringae* und *Phytophthora brassicae* sowie gegenüber dem Befall mit dem Fraßinsekt *Spodoptera littoralis* (Parisy et al. 2007; Schlaepfi et al. 2008; Ball et al. 2004). Auch die direkte Behandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit den Hormonen Salicylsäure und Jasmonsäure beeinflussen sowohl die Gesamtmenge von Glutathion in der Pflanze als auch das Verhältnis von reduziertem Glutathion gegenüber Glutathiondisulfid (Mou et al. 2003; Koornneef et al. 2008; Vanacker et al. 2000; Mateo et al. 2006). Wie genau diese Hormone den Glutathionhaushalt beeinflussen, ist noch nicht genau bekannt, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass der SA-Effekt über den Pentosephosphatweg vermittelt wird (Xiong et al. 2009).

Die Wahrnehmung von Änderungen im Redox-Milieu der Zelle durch Redox-Sensor Proteine erfolgt durch die Modifikation von in diesen Proteinen enthaltenen Cysteinen (Spoel & Loake 2011). Es wird jedoch nicht jedes Cystein modifiziert, da die chemische Umgebung der Cysteine eine Rolle für die Reaktivität der Thiolgruppe spielt (Weerapana et al. 2010). Bisher wurden die Nitrosylierung, die Bildung von Sulfensäure und Disulfidbrücken, die Glutathionylierung, die Bildung von Sulfinsäure und die Bildung von Sulfonsäure als mögliche Redox-basierte Modifikationen von Cysteinen beobachtet (Abb. 2.5) (Spadaro et al. 2010).



**Abbildung 2.5: Überblick über Redox-basierte Cysteinmodifikationen**

Der Oxidationsgrad steigt von links nach rechts an. Cystein Thiol (SH), S-Nitrosothiol (SNO), Sulfensäure (SOH), Disulfid (S-S), S-Glutathionylierung (SSG), Sulfinsäure (SO<sub>2</sub>H), Sulfonsäure (SO<sub>3</sub>H) (Spadaro et al. 2010)

Als Nitrosylierung wird die Modifikation eines Thiols durch Stickstoffmonooxid bezeichnet. Beispiele für Proteine, die durch Nitrosylierung reguliert werden, sind NONEXPRESSOR OF PR1 (NPR1), ein Schlüsselregulator der Pathogenabwehr,

und das SALICYLIC ACID BINDING PROTEIN 3 (SABP3), welches ebenfalls an der Pathogenabwehr beteiligt ist. Bei beiden Proteinen führt die Nitrosylierung zu einer Deaktivierung (Tada et al. 2008; Y.-Q. Wang et al. 2009).

Bisher konnte noch kein Enzym identifiziert werden, welches spezifisch die Nitrosylierung von Proteinen katalysiert. Vielmehr wird die Nitrosylierung durch die Verfügbarkeit von NO oder Übergangsmetallen, einer hydrophoben oder elektrostatischen Umgebung des Cysteins oder der Änderung von Protein-Protein Wechselwirkungen kontrolliert (Bosworth et al. 2009; Kim et al. 2005; Hess et al. 2001; Stamler et al. 1997). Die Transnitrosylierung, d.h. die Übertragung von NO von einem Thiol auf ein anderes spielt ebenfalls eine Rolle. So konnte die Übertragung von NO von nitrosyliertem Hämoglobin auf das interagierende Protein Band-3 beobachtet werden (Pawloski et al. 2001). Ein wichtiger NO-Donator ist nitrosyliertes Glutathion, S-Nitrosoglutathion (GSNO), welches ebenfalls Proteine transnitrosylieren kann (Spadaro et al. 2010). So weist die *Arabidopsis thaliana* *gsnor1-3* Mutante, der mit der S-Nitrosoglutathion Reduktase (GSNOR) das Enzym für den Abbau von GSNO fehlt, einen, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhten GSNO Gehalt auf, was zu verstärkter Nitrosylierung der Proteine in diesen Pflanzen führt (Feechan et al. 2005). Die Denitrosylierung der Proteine erfolgt in der Regel durch Enzyme der Thioredoxinfamilie (Tada et al. 2008).

Sulfensäure entsteht durch die Hydroxylierung einer Thiolgruppe und es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Säugerzellen mit Wasserstoffperoxid zur Hydroxylierung eines Cysteins im aktiven Zentrum von Protein-Tyrosinphosphatasen und somit zur Inaktivierung dieser Enzyme führt. Da es sich hierbei um eine reversible Modifikation des Cysteins handelt, könnte dies einen Mechanismus zur Regulation dieser Enzyme darstellen (Denu & Tanner 1998; Meng et al. 2002). Für eine Protein-Tyrosinphosphatase aus *Arabidopsis*, AtPTP1, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese durch die Hydroxylierung des Cysteins im aktiven Zentrum inaktiviert wird (Gupta & Luan 2003).

Die Bildung von Disulfidbrücken kann sowohl zwischen zwei Cysteinen innerhalb eines Proteins geschehen, als auch zwischen den Cysteinen unterschiedlicher Proteine. Diese Disulfidbrücken können dann zum Einen statisch sein und ihre Funktion in der Beibehaltung der korrekten Proteinkonformation haben, zum Anderen können sie aber auch reversibel und für die Regulation des Proteins wichtig sein. So liegt beispielsweise NPR1 im uninduzierten Zustand als Oligomer im Cytoplasma der

Zelle vor, welches durch Disulfidbrücken zusammengehalten wird. In Folge einer Pathogeninfektion werden diese Disulfidbrücken reduziert, was zu einer Freigabe der Monomere führt, welche daraufhin in den Zellkern gelangen können (Mou et al. 2003). Ein weiteres Protein, dessen Aktivität durch die Formation von Disulfidbrücken reguliert wird, ist der Sensor für oxidativen Stress aus *Saccharomyces cerevisiae*, YAP1p. Dieser Transkriptionsfaktor verfügt über ein Kernlokalisierungssignal und ein Kernexportsignal, was zu einem konstanten Austausch des Proteins zwischen Zellkern und Cytoplasma führt. Nach dem einsetzten von oxidativem Stress werden vier Cysteine in YAP1p oxidiert und es bilden sich zwei intramolekulare Disulfidbrücken, wodurch sich die Konformation des Proteins ändert und das Kernexportsignal maskiert wird. Dadurch kommt es zur Akkumulation von YAP1p im Zellkern (Kuge et al. 1997; Menezes et al. 2004).

Die S-Glutathionylierung spielt eine wichtige Rolle in Detoxifikationsprozessen. So wird GSH bei der Detoxifikation von ROS zu GSSG oxidiert und bei der Detoxifikation von Xenobiotika durch Glutathion S-Transferasen auf diese Substanzen übertragen. Die Glutathionverbindungen werden dann in die Vakuole oder den apoplastischen Raum transportiert und das GSSG kann durch die GSSG-Reduktase wieder zu GSH reduziert werden (Lillig et al. 2003). Die Glutathionylierung von Proteinen spielt unter anderem eine Rolle in der Regulation der Kohlenstofffixierung während der Photosynthese. Die Enzyme der Kohlenstofffixierung werden im Dunkeln durch die Bildung von Disulfidbrücken inhibiert. Die Reduktion dieser Disulfidbrücken und somit die Aktivierung dieser Enzyme erfolgt im Licht durch das Thioredoxin TRXf (Meyer et al. 2008). Durch die Glutathionylierung eines Cysteins wird die Regeneration dieser Thioredoxine durch die Ferredoxin-TRX Reduktase verhindert, was zur Deaktivierung der Thioredoxine und daraus folgend auch der Enzyme der Kohlenstofffixierung führt (Casagrande et al. 2002; Michelet et al. 2005). Weiterhin kann die Glutathionylierung von Proteinen zum Schutz der Proteine unter oxidativen Bedingungen dienen, da die Glutathionylierung von Thiolgruppen diese vor der weiteren Oxidation schützt, wodurch Sulfin- und Sulfonsäuren entstehen würden.

Sulfin- und Sulfonsäuren entstehen unter starkem oxidativen Stress, beispielsweise durch die weitere Oxidation von Sulfensäuren, und galten bis vor kurzem als irreversible Modifikationen. Zumindest können sie nicht durch das Thioredoxinsystem reduziert werden (Spadaro et al. 2010). Jedoch konnten Biteau et al. in Hefe ein Sulphiredoxin genanntes Enzym nachweisen, dass auch Sulfinsäuren unter ATP-

Verbrauch reduziert (Biteau et al. 2003). Inzwischen konnte auch in *Arabidopsis* ein Enzym mit Sulfinsäurereduktaseaktivität nachgewiesen werden (Rey et al. 2007). Allerdings stellt sich die Frage, ob es sich bei der Sulfinierung von Cysteinen um eine regulatorische Modifikation handelt, da sie nur unter extremen Bedingungen auftritt und schwer zu reduzieren ist.

Teilweise werden Proteine durch unterschiedliche Cysteinmodifikationen reguliert, wovon jede das Protein auf unterschiedliche Weise beeinflusst (Spadaro et al. 2010). So wird der Transkriptionsfaktor OxyR aus *Escherichia coli* durch die Einwirkung von Wasserstoffperoxid, GSSG, GSNO oder S-Nitrosocystein oxidiert, was in einer Sulfensäure, einem gemischten Disulfid oder einer Nitrosylierung resultiert. Jede dieser Modifikationen erfolgt an dem gleichen Cystein und beeinflusst die Konformation von OxyR und dessen DNA-Bindeeigenschaften auf unterschiedliche Weise (Kim et al. 2002).

## **2.4 Reaktive Elektrophile Spezies**

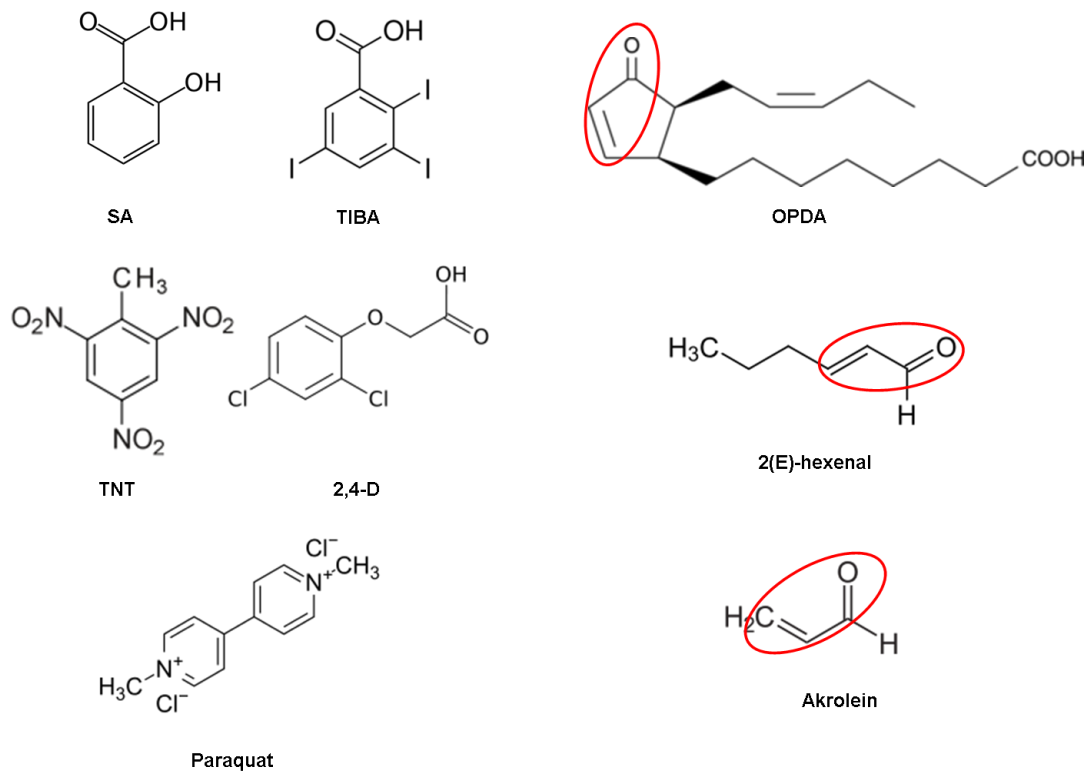
Bei Reaktiven Elektrophilen Spezies (RES) handelt es sich um Substanzen, die eine reaktive elektrophile Gruppe, wie zum Beispiel eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe, enthalten (Farmer & Davoine 2007). RES werden in der Zelle teilweise durch enzymatische Reaktionen produziert, wie beispielsweise OPDA und das flüchtige Aldehyd 2-(E)-Hexenal (Mueller et al. 2008; Matsui 2006), teilweise entstehen sie durch die nichtenzymatische Oxidation von Lipiden (Ishii et al. 2006; Winger et al. 2005; Weber et al. 2004; Mueller 2004). Allerdings handelt es sich bei RES nicht ausschließlich um im Stoffwechsel der Zelle entstandene Substanzen. So stellen viele Herbizide ebenfalls Reaktive Elektrophile Spezies dar. Paraquat und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure können zum Beispiel zu den RES gerechnet werden (Abb. 2.6). Für Paraquat ist bekannt, dass es Elektronen vom Photosystem I übernehmen kann. Das dadurch entstehende Paraquat Radikal kann  $O_2$  zu Superoxid ( $O_2^-$ ) reduzieren, welches durch Superoxiddismutasen zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt wird. Aus dem Wasserstoffperoxid kann dann in einer Fenton-Reaktion oder durch die Reaktion mit einem weiteren Paraquatradikal das hochreaktive Hydroxylradikal ( $HO^\bullet$ ) gebildet werden, das Membranlipide und andere Biomoleküle durch Oxidation schädigen kann (Babbs et al. 1989). Die Oxidation der Membranlipide führt dann zur Bildung weiterer RES. Eine weitere Quelle für RES

sind Kontaminanten aus Rückständen der industriellen Produktion. So handelt es sich bei dem Sprengstoff Trinitrotoluol (TNT) (Abb. 2.6) um ein starkes Phytotoxin, welches seine Reaktivität durch die Nitrogruppen am Benzolring erhält. Die Nitrogruppen entziehen dem Ring Elektronen und verleihen ihm dadurch einen elektrophilen Charakter (Beynon et al. 2009). Ein ähnlicher Elektronen ziehender Effekt geht von den Halogensubstituenten bei 2,4-D und TIBA, bzw. dem Sauerstoff bei SA aus (Abb. 2.6).

RES sind jedoch nicht in jedem Fall schädlich für die Zelle. In geringen Konzentrationen können sie einen positiven Effekt ausüben, indem sie die Expression von Genen induzieren, die an der Abwehr von Pathogenen oder an der Detoxifikation von Xenobiotika beteiligt sind. So konnte für OPDA und das Phytoprostan A<sub>1</sub> (PPA<sub>1</sub>) nachgewiesen werden, dass sie in *Arabidopsis* Gene aktivieren, die allen drei Stufen des pflanzlichen Detoxifikationsprogrammes zugeordnet werden, wie Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs), GSTs, und ATP-Bindekassetten Transporter (ABC-Transporter). Für die Induktion eines großen Teils dieser Gene durch OPDA und PPA<sub>1</sub> war die Anwesenheit von TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II erforderlich (Mueller et al. 2008). Fettsäureketodiene und Fettsäureketotriene, die eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe enthalten und daher auch als RES klassifiziert werden können, sind in *Arabidopsis* der Lage, die Glutathion S-Transferase *GST1* zu aktivieren, die ebenfalls durch die Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* induziert wird (Vollenweider et al. 2000) und Syringolin A, ein RES das von *Pseudomonas syringae* produziert und sekretiert wird, löst in Pflanzen an der Infektionsstelle Zelltod aus und vermittelt so eine Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen (Michel et al. 2006).

RES können sich prinzipiell auf zwei Arten auf den Stoffwechsel der Zelle auswirken. Zum Einen durch einen eher indirekten Effekt, indem sie das Redox-Gleichgewicht beeinflussen. Dies geschieht, da bei der Reduktion der reaktiven Doppelbindung in  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylgruppen Reduktionsäquivalente in Form von NADPH und Flavinmononukleotiden (FMN) verbraucht werden (Farmer & Davoine 2007). Ebenso können RES, da sie mit nukleophilen Gruppen reagieren können, durch die Oxidation der Sulfhydrylgruppe des Glutathions den Glutathionpool beeinflussen. Zum Anderen können RES einen direkteren Effekt ausüben, da sie Biomoleküle wie Proteine direkt modifizieren können. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor NUCLEAR

FACTOR-ERYTHROID 2-RELATED FACTOR 2 (NRF2) aus Säugetieren. Dieser interagiert mit dem Protein KELCH-LIKE ECH-ASSOCIATED PROTEIN 1 (KEAP1), was dazu führt, dass NRF2 im Cytoplasma zurück gehalten, ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut wird. Durch die Modifikation von Sulfhydrylgruppen in KEAP1 wird die Interaktion von KEAP1 mit NRF2 unterbunden, woraufhin NRF2 in den Zellkern gelangen und die Genexpression induzieren kann (Sato et al. 2006; Dinkova-Kostova et al. 2005). Ein Beispiel für ein Protein aus Pflanzen, das direkt durch RES modifiziert werden kann, ist die ALTERNATIVE OXIDASE (AOX), die durch 4-Hydroxy-2-nonenal modifiziert und dadurch inaktiviert wird (Winger et al. 2005).



**Abbildung 2.6: Strukturformeln unterschiedlicher Reaktiver Elektrophiler Spezies**

Der elektrophile Charakter der RES Salicylsäure (SA), 2,3,5-Triiodobenzoensäure (TIBA), Trinitrotoluol (TNT) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) wird durch die Elektronen ziehenden Substituenten am Benzolring vermittelt, bei Paraquat befinden sich die elektrophilen Zentren an den beiden Stickstoffatomen innerhalb der Ringe. Bei 12-Oxophytodienoic Säure (OPDA), 2(E)-Hexenal und Akrolein stellt die α,β-ungesättigte Carbonylgruppe (rote Markierung) das elektrophile Zentrum dar.

## **2.5 Ziel dieser Arbeit**

Die Fragestellung dieser Arbeit beruht auf den Ergebnissen von Tanja Siemsen und Benjamin Fode. In ihren Arbeiten konnten sie SCL14 als Interaktionspartner des bZIP-Transkriptionsfaktors TGA2 identifizieren und haben bei der weiteren Charakterisierung des Proteins durch Microarray Analysen festgestellt, dass SCL14 an der transkriptionellen Kontrolle von Genen beteiligt ist, die Teil des pflanzlichen Detoxifikationsprogrammes sind. Für die Aktivierung dieser Gene ist die Interaktion von SCL14 mit TGA2 nötig, da SCL14 nicht direkt an die Promotoren seiner Zielgene bindet. Diese Bindung wird durch TGA2 vermittelt. Passend zu diesen Ergebnissen konnten sie zeigen, dass *sc14* Mutanten auf SA, Isonikotinsäure (INA) und TIBA schlechter wachsen als Wildtyppflanzen, während Überexpressionslinien von SCL14 sogar ein besseres Wachstumsverhalten zeigen als der Wildtyp (Fode et al. 2008). Weiterhin konnte Neena Ratnakaran in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass die beiden NAC-Transkriptionsfaktoren ATAF1 und NAC032 SCL14-abhängig durch TIBA induziert werden und auf diesen Stimulus hin ihrerseits Detoxifikationsgene aktivieren (Ratnakaran 2014). Somit konnte in diesen Arbeiten sowohl eine direkte wie auch eine indirekte Regulation von Detoxifikationsgenen durch SCL14 nachgewiesen werden. Bisher konnte der Mechanismus, welcher zur Aktivierung von SCL14 führt, jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Durch Chromatin Immunopräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass der Komplex aus SCL14 und TGA2 im uninduzierten wie auch im induzierten Zustand an die DNA bindet (Fode et al. 2008). Die Bindung allein führt also nicht zur Aktivierung dieser Zielpromotoren. Eine mögliche Rolle könnte ein ständiger Austausch von SCL14 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma, der in Tabakprotoplasten beobachtet werden konnte, spielen. In unbehandelten Protoplasten ist die Fluoreszenz eines SCL14-GFP Fusionsproteins in der gesamten Zelle zu beobachten, nach der Behandlung mit dem Kernexportinhibitor Leptomycin B befindet sich SCL14 nur noch im Zellkern (Fode et al. 2008). Ob dieser Austausch auch in *Arabidopsis* Pflanzen vorkommt und wenn ja, unter welchen Bedingungen, soll an transgenen Pflanzen untersucht werden, die ein GFP-SCL14 Fusionsprotein unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren. Diese Pflanzen werden mit Xenobiotika wie TIBA aber auch mit Hormonen wie Salicylsäure und Jasmonsäure behandelt und die Lokalisation des Fusionsproteins durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Da sich die Fluoreszenz des GFP-SCL14 Fusionsproteins, aufgrund der sehr schwachen



Fluoreszenz in Blättern, in Wurzeln besser beobachten lässt, sollen diese Experimente an Wurzeln durchgeführt werden. Zusätzlich wird die Expression von SCL14 Zielgenen in Wurzeln von Wildtyppflanzen und *sc14/33* Mutanten nach der Behandlung mit diesen Substanzen in einem hydroponischen System untersucht, um einen eventuellen Effekt auf die Lokalisation von SCL14 mit der Genexpression korrelieren zu können. Dieses hydroponische System soll auch für ein Mikroarray Experiment genutzt werden, um in Wurzeln nach neuen Zielgenen von SCL14 zu suchen.

Die posttranslationale Regulation einiger an der Stressantwort beteiligter Transkriptionsfaktoren erfolgt über die Redox-Modifikation von in diesen Proteinen vorhandenen Cysteinen. So wird der Schlüsselregulator der pflanzlichen Pathogenabwehr, NPR1, welcher ebenfalls ein Interaktionspartner von TGA2 ist, durch Cysteinnitrosylierung und die Ausbildung von Disulfidbrücken reguliert (Tada et al. 2008) und auch der Transkriptionsfaktor YAP1p aus Hefe, welcher einen Sensor für oxidativen Stress darstellt, wird durch die Ausbildung von Disulfidbrücken aktiviert (Wood et al. 2003). Um die Bedeutung von Cysteinmodifikationen für die Aktivierung von SCL14 zu überprüfen, werden die neun in SCL14 enthaltenen Cysteine mutiert und die Fähigkeit dieser Mutanten, den Promotor des bereits bekannten SCL14 Zielgens *GSTU7* zu aktivieren, in einem transienten Protoplastensystem getestet. Die Mutanten, die in diesem System einen Unterschied zum Wildtypprotein zeigen, sollen ebenfalls als GFP-Fusion in transgenen Pflanzen stabil exprimiert und ihre intrazelluläre Lokalisation unter chemischen Stressbedingungen beobachtet werden. Da für die Aktivierung des SCL14/TGA2-Komplexes möglicherweise die Anwesenheit eines weiteren Proteins notwendig ist, soll in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment nach weiteren Interaktionspartnern von SCL14 gesucht werden. Da SCL14 in Hefe jedoch alleine bereits in der Lage ist, die Transkription der Reportergene zu induzieren, wird nur die GRAS-Domäne als Köder angeboten, die diese Autoaktivierungsfunktion nicht aufweist.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
3D Schüttler	Vibrax VXR basic	IKA
Agarose Gelsystem		Universität Göttingen
Analysewaage	Extend	Sartorius
Autoklav	VX-95	Systemec
Autoklav	VX-150	Systemec
CCD Kamera	ChemoCam	Intas
Elektrophoresestromgeber	PowerPac HC	BioRad
Elektrophoresestromgeber	EV243	Consort
Elektrophoresestromgeber	EV231	Consort
Feinwaage	572	Kern
Geldokumentationssystem (Agarosegele)	Transilluminator	Biostep
Geldokumentationssystem (PA-Gele)	Gel Imager	Intas
Heizblock	MHR 11	HLC Biotech
Heizblock	TH 26	HLC Biotech
Inkubator		memmert
Konfokales Lasermikroskop	DM6000CS	Leica
Kühlzentrifuge	Heraeus Fresco 17	ThermoScientific
Kühlzentrifuge	Rotina 38R	Hettich
Kühlzentrifuge	RC6+	Sorvall
Luminometer	CentroXS3 LB 960	Berthold Technologies
Magnetrührer	RH basic 2	IKA
Mikrotiterplattenleser	SynergyHT	BioTek
PA-Gelsystem	Mini Protean Tetra Cell	BioRad
PCR-Gerät	MyCycler	BioRad
Pflanzenwuchskammer		JohnssonControls
Pflanzenwuchsschrank	AR-66L/3	CLF Plant Climatics
pH-Meter	pH211	Hanna Instruments
Photometer	Libera S11	biochrom
qRT-PCR-Gerät	iCycler	BioRad
RNA-/DNA-Messgerät	NanoDrop2000	ThermoScientific
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	Sartorius
Schwenker	minigyro-rocker SSM3	Stuart
Sterilbank	Heraguard	ThermoScientific
Sterilbank S1	SAFE2020	ThermoScientific

Tischzentrifuge	Heraeus Pico 117	ThermoScientific
Trockensterilisator		memmert
Vakuumpumpe	MD 1C	vacuubrand
Wasserbad	1092	GFL
Wasserentsalzer	arium pro DI	Sartorius
Western Blot Halbtrockenkammer		Universität Göttingen

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Blotpapier 3 mm	Whatman
Deckgläser	Roth
Einweg Plastikmaterial	Biozym, Eppendorf, Greiner, Roth, Sarstedt
Elektroporationsküvetten	BioRad
Leukopor	BSNmedical
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one
Objektträger	Roth
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
PVDF-Membran	Millipore

### 3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
30 % Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1)	Roth
Ammoniumpersulfat	Biometra
Ampicillin	AGS
Bakterienagar	Roth
bovines Serumalbumin	Serva
Bromphenolblau	Roth
Cadmiumchlorid	Roth
EDTA	Applichem
Ethidiumbromid	Roth
Fluorescein	BioRad
Gelrite	Duchefa
Gentamycin	Duchefa
GSNO	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Leptomycin B	Santa Cruz Biotechnologies
MES	Roth
Methyljasmonat	Sigma-Aldrich
mPEG	Sigma-Aldrich
Murashige und Skoog Medium	Duchefa

NaCl	Roth
Natriumhypochloridlösung	Roth
Natriumnitroprussid	Roth
Natriumsalicylat	Merck
N-Ethylmaleimide	Sigma-Aldrich
Orange G	Sigma-Aldrich
Phenol	Sigma-Aldrich
Polyethylenglykol	Roth
Propidiumiodid	Roth
Rifampicin	Duchefa
Saccharose	Roth
SD-Medium	Gibco BRL
Select Agar	Life Technologies
Select Hefeextrakt	Gibco BRL
Spectinomycin	Duchefa
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
SYBR Green I	Cambrex
TEMED	Roth
TIBA	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Trypton	Oxoid
Tween20	Roth

### 3.1.4 Kits

Kit	Hersteller
BioTaq DNA Polymerase Kit	Bioline
Dual-luciferase reporter assay system	Promega
Ionic Detergent Compatibility Reagent	ThermoScientific
iProof High-Fidelity PCR Kit	BioRad
LuminataForte Western HRP Substrate	Millipore
NucleoBond PC500	Macherey-Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
Pierce 660 nm Protein Assay Kit	ThermoScientific
SuperSignal West Femto	ThermoScientific

### 3.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Biotaq DNA Polymerase	Bioline
Cellulase Onozuka R-10	Serva

Clonase Mix (BP,LR)	Invitrogen
DNaseI	ThermoScientific
iProof high fidelity DNA polymerase	BioRad
Macerozyme R-10	Serva
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, New England Biolabs
Reverse Transkriptase	MBI Fermentas
RNase A	Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

### 3.1.6 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas

### 3.1.7 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Quelle
$\alpha$ SCL14 (Serum) SA2495	polyklonal, aus Kaninchen	Dissertation Tanja Siemsen 2005
$\alpha$ HA-Tag	polyklonal, aus Kaninchen	abcam
$\alpha$ MYC-Tag	aus Maus	Cell Signaling Technology
$\alpha$ Kaninchen	aus Esel	Amersham
$\alpha$ Maus	aus Schaf	Amersham

### 3.1.8 Nukleinsäuren

#### 3.1.8.1 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
SCL14~300 bp-fwd	5'-CTGATGACGCTGATTTCTCTG-3'
SCL14~600 bp-fwd	5'-CTTCTAGGTCCAACAGTGTC-3'
SCL14~900 bp-fwd	5'-TAGCTATGCTCCTCCTCC-3'
SCL14~1200 bp-fwd	5'-CTCTTTTGGTGTATGTGC-3'
SCL14 1388-rev	5'-TGGTAAGCCTTCAACATGTCTGCTG-3'
SCL14~1500 bp-fwd	5'-AAACGCCAACACGATCCAC-3'
SCL14~1960 bp-fwd	5'-TCATTACTCGGCTGTGTTTG-3'
SCL14-attB-for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCA ATGGGTTCTTATCCGGATGGATTCC-3'
SCL14-attB-Stop-rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCT ATGAAGACGAAGGAACCCATAGAG-3'

SCL14C104S-fwd	5'-GATATGGAAGAGAAGCCTTCTATGTTTCATGACG CTTTGGCTC-3'
SCL14C104S-rev	5'-CAAAGCGTCATGAAACATAGAAGGCTTCTCTTCCA TATCCTCTTC-3'
SCL14C151S-fwd	5'-GCCCTGACGGTTCTTCTTCAGGTGGTG CTTTTAGTG-3'
SCL14C151S-rev	5'-GCACCACCTGAAGAAGAACCGTCAGGGCTATCAC-3'
SCL14C342S-fwd	5'-GAAATGTTTGATAAGATCTTGGTATCTGGCCCTGGG AAACCTGTATG-3'
SCL14C342S-rev	5'-GTTTCCCAGGGCCAGATACCAAGATCTTATCAAACA TTTCAGAAAGC-3'
SCL14C349S-fwd	5'-CCCTGGGAAACCTGTATCCATTCTTAACCAG AACTTTCC-3'
SCL14C349S-rev	5'-GTTCTGGTTAAGAATGGATACAGGTTTCCCA GGCCAC-3'
SCL14C400S-fwd	5'-GCTGATTTGAGGACTCTTTTGGTGTTATCTGCAC AAGCTGTATC-3'
SCL14C400S-rev	5'-GATACAGCTTGTGCAGATAACACCAAAGAGTCCT CAAATCAGC-3'
SCL14C477S-fwd	5'-CTTACCAGACATACATGTCGGTCTCCCC TTTCAAGAAAGC-3'
SCL14C477S-rev	5'-GCTTCCTTGAAAGGGGAGACCGACATGTATGT CTGGTAAG-3'
SCL14C561S-fwd	5'-GGTCATCGCTTGGCTCGATACTC TCAGCGACACAATG-3'
SCL14C561S-rev	5'-CATTGTGTCGCTGAGAGTATCGA GCCAAGCGATGACC-3'
SCL14C662S-fwd	5'-CTCGGCTGTGTTTGATATGTCTGACTCGAA GCTAGC-3'
SCL14C662S-rev	5'-GCTAGCTTCGAGTCAGACATATCAAACACA GCCGAG-3'
SCL14C691S-fwd	5'-GAGATTGTGAATGTTGTGGCTTCTGAAGGAACAGA GAGAGTGG-3'
SCL14C691S-rev	5'-CCACTCTCTGTTCCTTCAGAAGCCACAACA TTCACAATCTC-3'
SCL14GRAS-fwd	5'-GGGGGGCATATGGCTGATTTGAGGACTCTT TTGGTG-3'
SCL14GRAS-rev	5'-GGGGGGCCATGGTGAAGACGAAGGAACCC ATAGAG-3'
SCL14GRAS-attB-fwd	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTG CTGATTTGAGGACTCTTTTGGTG-3'
SCL14EcoNde-for	5'-GATATCGCATCGGCTCATATGATGGGTTCTTATCCG GATGGATTCC-3'
SCL14Sac-attB-rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACC GCGGAGCCGATGCGAGCTCTGAAGACGAAGGAAC CCATAGAGATG-3'
GFP-attB-for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATG GTGAGCAAGGGCGAGGA-3'
GFPEcoNde-rev	5'-CATATGAGCCGATGCGATATCCTTGTACAGCTC GTCCATGCC-3'

NAC017-attB-for	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTAT GGCGGATTCTTCACCGATTTC-3'
Nac017-attB-rev	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAG TCTTTCAAGAGAAGACTTCTACC-3'
SeqL1	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
SeqL2	5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
SeqpAct2-for	5'-CACGATGCACAGTTGAAGTGAAC-3'
SeqpAct2-rev	5'-GCTTACCCATACGATGTTCCAG-3'
gsnor1-3 LP	5'-TATAATGGTTCGACGCATATTTTTC-3'
gsnor1-3 RP	5'-CAAGGAAAGAGACCTTCAGGATC-3'
o8409mod	5'-CCATATTGACCATCATACTCATTGC-3'
o3144	5'-GTGGATTGATGTGATATCTCC-3'
SALK_025104 LP	5'-CAAGGAGCCAGTTCTCATCAG-3'
SALK_025104 RP	5'-CGAAATTTACCAGGCAATTCC-3'
SALK_117000 LP	5'-AGGGTTTCGATTTTCATCCAAC-3'
SALK_117000 RP	5'-AAAGACATGGAAACGTCATGG-3'
GSTU7	Quantitect
UGT73B3	Quantitect
AT3G04130	Quantitect
AT5G61800	Quantitect
NAC017	Quantitect

### 3.1.8.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDONR201-SCL14	SCL14 wurde mittels PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden mit GW-Sequenzen aus cDNA amplifiziert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C1S	Cystein 104 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C2S	Cystein 151 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit

pDONR201-SCL14C3S	Cystein 342 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C4S	Cystein 349 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C5S	Cystein 400 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C6S	Cystein 477 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C7S	Cystein 561 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C8S	Cystein 662 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit



pDONR201-SCL14C9S	Cystein 691 wurde mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C5,9S	Die Cysteine 400 und 691 wurden mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C5-9S	Die Cysteine 400 - 691 wurden mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pDONR201-SCL14C1-9S	Die Cysteine 104 - 691 wurden mittels PCR durch spezifische Oligonukleotide durch ein Serin ersetzt, ein Vollängenfragment durch überlappende PCR synthetisiert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14 und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C1S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C1S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C2S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C2S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C3S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C3S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C4S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C4S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C5S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C5S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C6S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C6S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C7S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C7S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pB2GW7HA-SCL14C8S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C8S und pB2GW7HA	diese Arbeit

pB2GW7HA-SCL14C9S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C9S und pB2GW7HA	diese Arbeit
pUBQ10-Renilla		M. Zander
GSTU7-Prom-Firefly		C. Thurow
pGBKT7-SCL14GRAS	Die GRAS-Domäne von SCL14 wurde mit spezifischen Primer mittels PCR amplifiziert und klassisch in pGBKT7 kloniert	P. Demeshko
pGBKT7-RGAGRAS	Die GRAS-Domäne von RGA wurde mit spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert und klassisch in pGBKT7 kloniert	J. Truskina
pDONR201-NAC017	NAC017 wurde mittels PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden mit GW-Sequenzen aus cDNA amplifiziert und per BP-Reaktion in pDONR201 kloniert	p. Demeshko
pDESTGAD-NAC017	LR-Reaktion von pDONR201-NAC017 mit pDESTGAD	diese Arbeit
pDESTGAD-NAC002		N. Ratnakaran
pDESTGAD-NAC032		N. Ratnakaran
pDESTGAD-TGA2		J. Oberdiek
pDESTGAD-XPOI		J. Oberdiek
pDESTGAD-SCL14	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14 mit pDESTGAD	diese Arbeit
pDESTGAD-SCL14C5,9S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C5,9S mit pDESTGAD	diese Arbeit
pDESTGAD-SCL14C5-9S	LR-Reaktion von pDONR201-SCL14C5-9S mit pDESTGAD	diese Arbeit

### 3.1.9 Organismen

#### 3.1.9.1 Bakterien

Bakterium	Eigenschaften	Referenz
<i>Agrobacterium thumefaciens</i> GV3101	PMP90RK <i>rifr</i> , <i>gmr</i>	
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F-, <i>gyrA</i> 96 (Nal <sup>r</sup> ), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk+), <i>glnV44</i> , <i>deoR</i> , D ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169	(Hanahan 1983)

[p80dD(*lacZ*)M15]**3.1.9.2 Hefe**

Hefestamm	Eigenschaften	Referenz
PJ69-4A	MAT $\alpha$ , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , GAL2-ADE2, LYS2 ::GAL1-HIS3, <i>met2::GAL7-lacZ</i>	(James et al. 1996)

**3.1.9.3 Pflanzen**

Genotyp	Beschreibung	Referenz
Col-0	Wildtyp	NACS Bestandsnummer N1920
<i>scl14/33</i>	Kreuzung der <i>knockout</i> Mutanten <i>scl14</i> (SALK_126931) und <i>scl33</i>	diese Arbeit
<i>gsnor1-3</i>	<i>knockout</i> Mutante mit reduzierter GSNOR Aktivität	(Feechan et al. 2005)
<i>gsnor1-3/scl14</i>	Kreuzung der <i>knockout</i> Mutanten <i>scl14</i> und <i>gsnor1-3</i>	diese Arbeit
<i>tga256</i>	<i>knockout</i> Mutante der drei Klasse II TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6	(Zhang et al. 2003)
<i>nac017</i>	<i>knockout</i> Mutante des Transkriptionsfaktors <i>NAC017</i> (SALK_117000)	diese Arbeit
<i>scl14/33</i> 35S:HA-GFP-SCL14	Expressionslinie, die HA-GFP-SCL14 unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert	diese Arbeit
<i>scl14/33</i> 35S:HA-GFP-SCL14C5,9S	Expressionslinie, die HA-GFP-SCL14C5,9S unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert	diese Arbeit
<i>scl14/33</i> 35S:HA-GFP-SCL14C5-9S	Expressionslinie, die HA-GFP-SCL14C5-9S unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors exprimiert	diese Arbeit

**3.1.10 Nährmedien**

Nährmedium	Zusammensetzung
dYT	20 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl
LB	10 g/l Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl
MSS	4.4 g/L MS medium, 0,5 g/L MES, 5 g/L Saccharose, pH 5.7 with KOH
YEB	10 g/L Fleischextrakt, 2 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, pH 7.0 with NaOH, nach dem Autoklavieren auf 2 mM MgSO <sub>4</sub> einstellen
YPAD	10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton, 20 g/L Glucose, 100 mg/L Adeninhemisulfat, pH 6 mit HCl, 14 g/L Agar
SD-Medium	6,7 g/L Yeast Nitrogen Base, 20 g/L Glucose, 0,61 g/L SD-Leu,-Ade-His,-Trp oder 0,62 g/L SD-Leu,-Trp,-Ura + 20 mg/L Uracil, pH 5,6 mit NaOH, 12 g/L Agar

**3.1.11 Standardpuffer**

Puffer	Zusammensetzung
TAE (20x)	0.8 M Tris, 2.3 % (v/v) Essigsäure, 20 mM EDTA
TBS (10x)	24.2 g Tris, 80 g NaCl, pH 7.6
TBST (1x)	1x TBS + 0.1 % Tween 20
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris, 188 mM glycine, 20 % Methanol

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden**

#### **3.2.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli***

##### **Alkalische Lyse**

Geringe DNA Mengen zu analytischen Zwecken wurden aus *E. coli* mittels der Alkalischen Lyse isoliert. Hierfür wurden die Bakterien aus 1,5 mL Übernachtskultur durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 100 µL Puffer I resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µL Puffer II und 1 min Inkubation bei RT erfolgte die Lyse der Bakterien. Nach Neutralisation der Lösung durch Zugabe von 150 µL Puffer III wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde mit Chloroform versetzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde die wässrige Phase mit 1 mL Ethanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, für 10 min bei 37 °C getrocknet und in 20 µL vollentsalztem Wasser aufgenommen.

##### **Isolierung geringer Mengen hochreiner DNA**

Für Sequenzierungen wurde zur DNA-Isolation das *Plasmid Mini Kit*<sup>®</sup> von Macherey und Nagel verwendet. Die DNA-Isolation erfolgte aus 5 mL Übernachtskulturen nach Angaben des Herstellers.

##### **Isolierung großer Mengen hochreiner DNA**

Zur Transformation von Hefen oder Protoplasten wurden das *Plasmid Midi Kit*<sup>®</sup> oder das *Plasmid Maxi Kit*<sup>®</sup> von Macherey und Nagel verwendet. Die DNA-Isolation erfolgte aus 200 mL bzw. 400 mL Übernachtskulturen nach Angaben des Herstellers.

#### **3.2.1.2 DNA-Isolation aus *A. thumefaciens***

Die Isolation von Plasmid – DNA aus *A. thumefaciens* erfolgte aus 5 mL einer zwei Tage alten Agrobakterienkultur. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren für 1 min

bei 13000 rpm geerntet, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 300 µL Puffer I (50 mM Tris-HCl pH8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 300 µL Puffer II (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend folgte die Neutralisation der Lösung durch Zugabe von 300 µL Puffer III (294 g/L Kaliumacetat, 5% Ameisensäure) und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur abgetrennt. 600 µL des Überstandes wurden mit 500 µL Phenol – Chloroform – I – Mix (PCI – Mix) versetzt, gemischt und für 1 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit 500 µL PCI – Mix versetzt, gemischt und für 1 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde die wässrige Phase mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und für 15 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das entstandene Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 12 µL Wasser gelöst.

### **3.2.1.3 DNA-Isolation aus *A. thaliana***

Für die DNA-Isolation aus *Arabidopsis thaliana* wurden Blattproben in Stickstoff gemörsert und das Pulver mit 400 µL Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS) versetzt, gemischt und für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 300 µL des Überstandes wurden mit 300 µL Isopropanol versetzt, gemischt und für 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Die DNA wurde 10 min bei 37 °C getrocknet und in 100 µL H<sub>2</sub>O 10 min bei 65 °C gelöst.

### **3.2.1.4 Polymerase Kettenreaktion**

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Hierbei macht man sich die Fähigkeit von DNA-Polymerasen zu nutze, eine DNA-Matrize *in vitro* zu replizieren. Da die DNA-Polymerase als Startpunkt für die Amplifikation ein dem 5´-Ende des zu vervielfältigenden Bereiches komplemen-

täres Oligonukleotid benötigt, lässt sich über die Gestaltung der Oligonukleotide der Zielbereich festlegen. Da die Oligonukleotide in das Amplifikat mit eingebaut werden, können so auch beispielsweise Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder Mutationen in die DNA-Sequenz eingefügt werden.

Die Polymerase Kettenreaktion unterteilt sich in mehrere Schritte. Während der **primären Denaturierung** werden die DNA-Stränge aufgeschmolzen, sodass in der **Anlagerungsphase** die Startoligonukleotide an die komplementären Bereiche der Zielsequenz binden können. Während der **zyklischen Elongation** erfolgt die Amplifikation der DNA. Durch die **zyklische Denaturierung** werden die neu entstandenen DNA-Stränge aufgeschmolzen, sodass sich erneut Oligonukleotide anlagern können. Die Schritte zwei bis fünf werden zyklisch wiederholt. Hierdurch kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA. Die **finale Elongation** dient dazu, unvollständig amplifizierte DNA-Fragmente zu vervollständigen. Tabelle 3.1 zeigt ein Beispielrezept einer PCR-Reaktion, Tabelle 3.2 ein beispielhaftes Ablaufschema.

**Tabelle 3.1: Beispielrezept eines 50 µL PCR Ansatzes**

	Konzentration	Endkonzentration
DNA-Matrize	1 µg/µL	0,02 µg/µL
Oligonukleotid 1	10 µM	0,5 µM
Oligonukleotid 2	10 µM	0,5 µM
Polymerase	1 U/µL	0,02 U/µL
Puffer	5X	1X
dNTPs	10 mM	200 µM
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL	ad 50 µL
Endvolumen	50 µL	50 µL

**Tabelle 3.2: Beispielhaftes Ablaufschema einer PCR Reaktion**

	Dauer	Temperatur	Wiederholungen
primäre Denaturierung	30 sek	95 °C	1 x
zyklische Denaturierung	5-10 sek	95 °C	
Anlagerungsphase	10-30 sek	58-63 °C	35 x
zyklische Elongation	2 min	72 °C	
finale Elongation	10 min	72 °C	1 x

### **3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen ca. 0,5 kb und 25 kb Größe. Der Trenneffekt beruht auf der Tatsache, dass die Agarose ein molekulares Sieb bildet, durch dessen Maschen große DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld langsamer wandern als kleine.

Zum anfertigen der Gele wurde die Agarose in der Konzentration von 1 % in TAE-Puffer aufgekocht. Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 5x Probenpuffer gemischt. Als Größenstandard diente der „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Fermentas), welcher einen Bereich von 0,25 kb bis 10 kb abdeckt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 45 Minuten. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Lauf für 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad mit 0,5µg/mL Ethidiumbromid inkubiert. Die Isolation der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel erfolgte mit dem Kit *Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up*<sup>®</sup> der Firma Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers.

### **3.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Absorptionsmessung mit dem NanoDrop 2000<sup>®</sup> der Firma Thermo Scientific bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde über das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein optimales OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Verhältnis für DNA ist 1,8 und für RNA 1,9-2,0.

### **3.2.1.7 Restriktionsspaltung von DNA**

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen des Typs II lassen sich DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch schneiden. Die Enzyme binden im DNA-Strang eine Erkennungssequenz, welche in der Regel aus sechs bis acht Basenpaaren besteht und im Doppelstrang ein Palindrom bildet. Durch den Schnitt entstehen entweder glatte Enden oder ein 3´- bzw. ein 5´-Überhang.

Zur Ermittlung der für die Spaltung einer gegebenen DNA-Menge erforderliche Enzymmenge wurde folgende Formel verwendet:



$$\frac{bp[\lambda - DNA] \times Schnittstdlen[DNA] \times \mu g[DNA]}{Schnittstdlen[\lambda - DNA] \times bp[DNA] \times Zeit(Stunden)}$$

Für eine Restriktionsspaltung wurden 1 – 2 µg DNA mit der ermittelten Menge Enzym und 2 µL des entsprechenden 10x Puffers in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde für zwei Stunden nach Angaben des Herstellers bei 37 °C bzw. 65°C inkubiert. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die entstandenen DNA-Fragmente gegebenenfalls aus dem Agarosegel extrahiert.

### **3.2.1.8 Ligation von DNA-Molekülen**

Die Ligation von durch Restriktionsspaltung erzeugten DNA-Fragmenten erfolgte durch die T4 DNA-Ligase. Hierbei wurden 100 ng geschnittenes Plasmidrückgrat verwendet. Das in das Plasmid einzufügende DNA-Fragment wurde im dreifachen molaren Überschuss eingesetzt. Die notwendige Menge an DNA-Fragment wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{ng_{Plasmid} \times kb_{Fragment}}{kb_{Plasmid}} \times 3$$

Die DNA wurde mit 2 µL 10x Reaktionspuffer und 5 Units T4 DNA-Ligase in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurden 10 µL des Ansatzes zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

### **3.2.1.9 Dephosphorylierung von DNA**

Um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation eines Plasmids während einer Ligationsreaktion zu verringern, wurde das mit Restriktionsenzymen geschnittene Plasmid mit der *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte durch Zugabe von 5 Units CIAP zum Restriktionsansatz nach Beendigung der Restriktionsreaktion und Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C.

### **3.2.1.10 Gateway®-Klonierung**

Die gateway® Technologie der Firma Invitrogen zur Klonierung basiert auf der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda und stellt eine einfache und schnelle Methode zur Klonierung eines DNA-Fragmentes in unterschiedliche Vektoren dar (Landy 1989; Hartley et al. 2000). Alle Klonierungen erfolgten wie in der Gebrauchsanweisung Gateway® Technology with Clonase™ II (25-0749) in der Version vom 22. Mai 2009 angegeben.

### **3.2.1.11 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma SeqLab. Für eine Sequenzierungsreaktion wurden 1,2 µg Plasmid mit 30 pmol Oligonukleotid in 15 µL H<sub>2</sub>O gemischt.

### **3.2.1.12 Transformation von *E. coli***

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mittels der Hitzeschockmethode nach Hanahan (Hanahan 1983). 200 µL kompetente Bakterien wurden für 30 min zum Auftauen auf Eis gestellt. Anschließend wurde DNA zugegeben (in der Regel 10 µL eines Ligationsansatzes oder 0,5 µL einer Plasmidpräparation) und die Bakterien weitere 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden und eine weitere Inkubation auf Eis für 3 min. Anschließend wurden die Bakterien mit 800 µL dYT-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, bevor sie auf LB-Agarplatten mit zugesetztem Antibiotikum ausplattiert wurden. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### **3.2.1.13 Transformation von *A. thumefaciens***

Die Transformation von *Agrobacterium thumefaciens* GV3101 erfolgte mittels der Elektroschockmethode. 50 µL kompetente Bakterien wurden zum Auftauen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,5 µL einer DNA-Präparation zugegeben und für 5 ms ein Elektroschock (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω) appliziert, die Bakterien in 950 µL YEB-Medium aufgenommen und für zwei Stunden bei 29 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf YEB-Agarplatten mit

zugewasstem Antibiotikum ausplattiert und die Agarplatten für zwei bis drei Tage bei 29 °C inkubiert.

#### **3.2.1.14 Stabile Transformation von *A. thaliana***

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer nach Clough (Clough 2005). Es wurde eine 20 mL Kultur von mit dem zu übertragenden Plasmid transformierten Agrobakterien in YEB-Medium angesetzt und für zwei Tage bei 29 °C unter Schütteln inkubiert. 5 mL dieser Kultur wurden zur DNA-Extraktion verwendet (Abschnitt 3.2.1.5) um mittels Restriktionsverdau die Anwesenheit des zu übertragenden Plasmids zu überprüfen. Mit den verbliebenen 15 mL wurde eine 400 mL Kultur angeimpft und bei 29 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 5000 rpm und RT geerntet und das Pellet in 5% Saccharoselösung mit 0,02% Silvet L-77 gelöst und die Lösung auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 eingestellt. Blühende *Arabidopsis* Pflanzen wurden in die Bakterienlösung getaucht und über Nacht mit einer Haube abgedeckt. Die Selektion auf positive Transformanten erfolgte in der nächsten Generation durch Besprühen mit dem Herbizid BASTA<sup>®</sup> gegen welches der Übertragene Vektor ein Resistenzgen trägt.

### **3.2.2 Biochemische Standardmethoden**

#### **3.2.2.1 Proteinextraktion aus *A. thaliana***

Zur Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana* wurden Wurzel- oder Blattproben gemörsert, mit 100 µL Laemmli Puffer (Laemmli 1970) gemischt und 5 min bei 95 °C unter Schütteln erhitzt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer verworfen.

#### **3.2.2.2 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae***

Für die Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden die Hefezellen einer 20 mL Übernachtskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,3 durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren

und bei 37 °C aufgetaut. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurden die Hefezellen mit 75 µL Proteinextraktionspuffer (8 M Harnstoff; 5 % SDS; 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,4 mg/mL Bromphenolblau; 10 µL/mL β-Mercaptoethanol; 0,1 mM EDTA) pro 7,5 OD-Einheiten resuspendiert, mit 80 µL Glasperlen (Durchmesser 425-600 µm) versetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute bei RT auf einem Schüttler bei hoher Geschwindigkeit inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und RT wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das verbleibende Pellet wurde in dem gleichen Volumen Proteinextraktionspuffer resuspendiert wie zuvor und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und RT wurden beide Überstände vereinigt und das Pellet verworfen.

### **3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten erfolgte mit dem *Pierce 660 nm Protein assay*<sup>®</sup> der Firma ThermoScientific. 5 µL des zu messenden Proteinextraktes wurden mit 150 µL Messreagenz gemischt und die Absorption bei 660 nm bestimmt. Da die für die Proteinextraktion verwendeten Puffer SDS enthielten, mussten dem Messreagenz 50 mg/mL *Ionic Detergent Compatibility Reagent*<sup>®</sup> zugegeben werden. Um die Proteinkonzentration berechnen zu können, wurde eine Referenzreihe mit 1 µg, 3 µg, 6 µg und 9 µg BSA gemessen.

### **3.2.2.4 SDS – Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli 1970), bestehend aus einem Sammelgel (4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % Ammoniumpersulfat (APS); 0,1 % TEMED) und einem Trenngel (10 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED). Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS) bei 200 V für 45 min.

### **3.2.2.5 Protein Immunoblot**

Die spezifische Detektion von Proteinen nach der Auftrennung durch SDS-PAGE erfolgte mittels Western Blot. Hierbei wurden die Proteine in einer Halbtrockenzelle auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Trenngel wurde für 10 Minuten in 1x Transferpuffer (20 % Methanol; 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS) äquilibriert und die Membran für eine Minute in Methanol aktiviert. Anschließend wurde der Blot in der Halbtrockenzelle aus drei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatman Papier, der Membran, dem Gel und drei weiteren Lagen in Transferpuffer getränktem Whatman Papier aufgebaut. Der Proteintransfer erfolgte für zwei Stunden bei RT und einer Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> Membran. Nach dem Transfer folgte das Blocken der Membran in TBST mit 2 % (w/v) Milchpulver für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C unter konstantem Schwenken. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte in TBST mit 2 % (w/v) Milchpulver für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schwenken. Anschließend wurde die Membran 3x 5 Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper erfolgte in TBST mit 2 % (w/v) Milchpulver für zwei Stunden bei RT unter konstantem Schwenken. Nach dem Waschen der Membran in TBST für 3x 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit einer Substratlösung für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase für fünf Minuten und die Detektion der Peroxidaseaktivität mit einer CCD-Kamera.

### **3.2.3 Pflanzenanzuchtbedingungen**

#### **3.2.3.1 Pflanzenanzucht auf Erde**

Zur Pflanzenanzucht auf Erde wurden oberflächensterilisierte Samen auf Anzuchterde (Archut, Fruhstorfer Erde, T25, Str1 fein) ausgelegt, über Nacht bei 4 °C stratifiziert und unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit; 22 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit am Tag; 18 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit bei Nacht; 120 µmol Photonen/m<sup>2</sup>/sek) oder Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkelheit; 22 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit bei Tag und Nacht; 90 µmol Photonen/m<sup>2</sup>/sek) kultiviert.

### **3.2.3.2 Sterile Pflanzenanzucht in einem hydroponischen System**

Zur Pflanzenanzucht im hydroponischen System wurden oberflächensterilisierte Samen unter sterilen Bedingungen in Kulturgläsern (Abb. 3.1) mit MSS-Medium ausgelegt, die Gläser mit Parafilm M<sup>®</sup> versiegelt und für 10 Tage unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit; 22 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit bei Tag und Nacht; 90  $\mu\text{mol Photonen/m}^2/\text{sek}$ ) kultiviert.

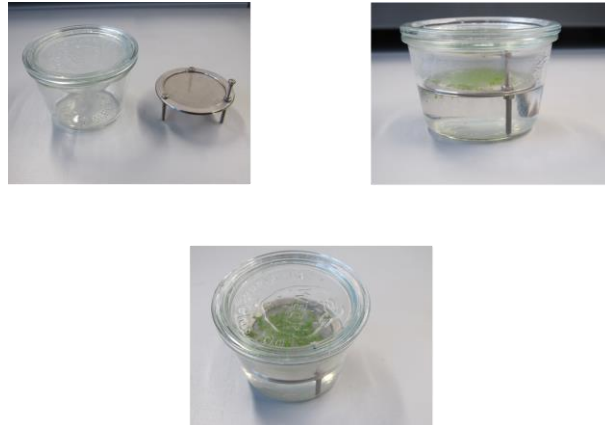


Abbildung 3.1: Anzuchtgläser zur Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* im hydroponischen System.

### **3.2.3.3 Sterile Pflanzenanzucht auf mit Nährmedium beschichteten Objektträgern und Schrägagarplatten**

Zur Pflanzenanzucht auf festem Nährmedium (MSS mit 0,7 % Gelrite) wurden oberflächensterilisierte Samen unter sterilen Bedingungen auf mit Nährmedium beschichteten Objektträgern oder auf Schrägplatten ausgelegt, über Nacht bei 4 °C stratifiziert und unter Langtagbedingungen (14 Stunden Licht/10 Stunden Dunkelheit; 23 °C bei Tag und Nacht, keine Regulation der Luftfeuchtigkeit; 90  $\mu\text{mol Photonen/m}^2/\text{sek}$ ) kultiviert.

### **3.2.4 Oberflächensterilisation von Samen**

Die Oberflächensterilisation von Samen erfolgte in einem Exsikkator unter leichtem Vakuum in einer Chlorgasatmosphäre. Für die Erzeugung dieser Chlorgasatmosphäre wurde dem Exsikkator ein Gemisch aus 100 mL Natriumhypochlorid und 5 mL Salzsäure beigefügt. Für die Aussaat auf Erde betrug

die Dauer der Sterilisation zwei Stunden, für die Aussaat in hydroponischen Kulturen oder auf festem Nährmedium vier Stunden.

### **3.2.5 Transkriptomanalyse**

#### **3.2.5.1 RNA Extraktion**

Die Extraktion von RNA aus Blatt- und Wurzelgewebe erfolgte mit der TRIZOL-Methode nach Chomczynski (Chomczynski 1993). Das Pflanzenmaterial wurde in Stickstoff gemörsert und 50 µL – 250 µL des Pulvers mit 1,3 mL Extraktionspuffer (380 mL/L Phenol, gesättigt mit 0,1 M Citratpuffer pH 4,3; 0,8 M Guanidinthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 33,4 mL/L 3 M Na-Acetatlösung pH 5,2; 5 % Glycerin) versetzt und 10 Minuten bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 260 µL Phenol zugegeben, worauf eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei RT unter Schütteln erfolgte. Die Trennung der wässrigen Phase mit den Nukleinsäuren und der organischen Phase mit Proteinen und Zelltrümmern erfolgte durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C. 800 µL der wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µL Isopropanol und 300 µL Hochsalzpuffer (1,2 M Natriumchlorid; 0,8 M tri-Na-Citrat) versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C. Die Nukleinsäurepellets wurden mit 70 % Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Nach dem Trocknen der Pellets für 10 Minuten bei RT wurden die Nukleinsäuren in 15 µL – 50 µL autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O durch Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C und zweimaligem Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff gelöst.

#### **3.2.5.2 Synthese von cDNA**

Für die Synthese von cDNA wurde 1 µg RNA eingesetzt. Diese wurde zuerst für 30 Minuten bei 37 °C mit DNaseI behandelt, um Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA zu verhindern. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 25 mM EDTA und Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C. Als Startoligonukleotide für die Synthese der cDNA wurden Zufallsnonamere und oligo-dT Oligonukleotide verwendet. Die Anlagerung an die RNA erfolgte für 10 Minuten bei 70 °C. Die

Elongation fand für 70 Minuten bei 42 °C durch die Reverse Transkriptase H- (Fermentas) statt, gefolgt von einem Schritt zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 10 Minuten bei 70 °C. Tabelle 3.3 zeigt den schematischen Ablauf der cDNA Synthese und die Konzentrationen der verwendeten Komponenten.

**Tabelle 3.3: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese und der verwendeten Komponenten**

	Dauer/Temperatur	Komponenten	Endvolumen
DNA-Verdau	30 min/ 37 °C	1x DNase Puffer 0,1U/μL DNase	10 μL
DNase Inaktivierung	10 min/ 65 °C	2,5 mM EDTA	10,5 μL
Anlagerung der Oligonukleotide	10 min/ 70 °C	20 pmol oligo-dT 200 pmol Randomnonamer	12,2 μL
Elongation	70 min/ 42 °C	1x Puffer Reverse Transkriptase dNTPs (jeweils 1 mM) 3 U/μL Reverse Transkriptase	20 μL
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	10 min/ 70 °C		20 μL

### **3.2.5.3 Quantitative Echtzeit PCR (qRT – PCR)**

Für die Quantifizierung der cDNA mittels quantitativer Echtzeit PCR (qRT-PCR) wurde die Fluoreszenz des Farbstoffes SyberGreen<sup>®</sup> gemessen. Dieser Farbstoff fluoresziert nur, wenn er an DNA bindet, so dass die Fluoreszenz in einem PCR-Ansatz mit der vorhandenen DNA-Menge zunimmt. Die qRT-PCR wurde im iCycler<sup>®</sup> der Firma BioRad durchgeführt, *Ubiquitin5* diente als Referenzgen. Die relative Genexpression wurde mit der  $2^{-[C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzen})]}$ -Methode (Schmittgen & Livak 2008) berechnet. Tabelle 3.4 zeigt die Konzentrationen der verwendeten Komponenten, Tabelle 3.5 das verwendete PCR-Programm.



**Tabelle 3.4: Beispielrezept für eine qRT-PCR Reaktion**

	Konzentration	Endkonzentration
Reaktionspuffer	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM
dNTPs	10 mM	100 µM
Oligonukleotid 1	4 µM	0,4 µM
Oligonukleotid 2	4 µM	0,4 µM
SybrGreen Mol Probes 1:1000	10x	0,1x
Fluorescein 1µM / 1:1000	1 µM	10 nM
DNA-Polymerase	5 U/µL	0,25 U
cDNA 1:10	1x	0,04x
H <sub>2</sub> O		ad 25 µL

**Tabelle 3.5: Ablauf einer qRT-PCR Reaktion**

	Dauer	Temperatur	
primäre Denaturierung	2 min	95 °C	1x
Denaturierung	20 sek	95 °C	39x
Anlagerungsphase	20 sek	55 °C	
Elongation	40 sek	72 °C	
finale Elongation	4 min	72 °C	1x
	1 min	95 °C	
	1 min	55 °C	
Schmelzkurve	10 sek	55 °C - 95 °C	81x 0,5 °C-Schritte

### 3.2.5.4 Microarrayanalyse

Die Transkriptome aus Wurzeln der Genotypen Col-0 und *sc14/33* nach der Behandlung mit 1 mM Salicylsäure für eine Stunde wurden mittels Microarrayanalyse miteinander verglichen. Die Pflanzen wurden in hydroponischen Kulturen für 10 Tage unter Langtagbedingungen angezogen. Die Extraktion der RNA erfolgte wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben. Für jede Probe wurde Material aus fünf Anzuchtgläsern vereinigt. Die Qualitätskontrolle der RNA und die Durchführung der Microarrayanalyse erfolgten durch das Transkriptomanalyselabor der Universität Göttingen. Es wurde der GeneChip® Gene 1.0 ST der Firma Affymetrix verwendet.

### **3.2.6 Behandlung von *A.thaliana* mit Chemikalien**

#### **3.2.6.1 Chemikalienbehandlung im hydroponischen System**

Für die Behandlung von Wurzeln mit Chemikalien in hydroponischen Kulturen wurden die betreffenden Substanzen direkt dem Nährmedium (MSS) zugesetzt. Hierfür wurde das Metallsieb, auf dem die Pflanzen wuchsen kurz aus dem Anzuchtglas genommen, die Chemikalie mit dem Nährmedium vermischt, das Sieb wieder eingesetzt und der Deckel wieder aufgesetzt, ohne das Glas jedoch erneut mit Parafilm M<sup>®</sup> zu versiegeln. Die Behandlung der Pflanzen mit den Chemikalien erfolgte für eine bis vier Stunden unter Lichtbedingungen.

#### **Salicylsäure**

Für die Behandlung mit Salicylsäure wurde Natriumsalicylat mit einer Konzentration von 1M in Wasser gelöst und 1:1000 im Nährmedium verdünnt. Als Kontrollbehandlung diente Wasser.

#### **2,3,5 – Triiodobenzoessäure (TIBA)**

2,3,5-Triiodobenzoessäure wurde mit einer Konzentration von 50 mM in DMSO gelöst und 1:500 im Nährmedium verdünnt. Als Kontrolle diente 0,2 % DMSO.

#### **Methyljasmonat**

Methyljasmonat wurde mit Ethanol auf eine Konzentration von 0,5 M eingestellt und 1:10000 im Nährmedium verdünnt. Als Kontrolle diente 0,01 % Ethanol.

#### **3.2.6.2 Chemikalienbehandlung auf mit Nährmedium beschichteten**

##### **Objektträgern**

Für die Chemikalienbehandlung wurden die Wurzeln von 10 Tage alten, auf mediumbeschichteten (MSS) Objektträgern gewachsenen, Pflanzen für 30 – 60 Minuten mit der entsprechenden Chemikalienlösung überschichtet.

### **Salicylsäure**

Für die Behandlung mit Salicylsäure wurde Natriumsalicylat mit einer Konzentration von 1M in Wasser gelöst und 1:1000 mit Nährmedium (MSS) verdünnt. Als Kontrollbehandlung diente Nährmedium (MSS) ohne Zusätze.

### **2,3,5 – Triiodobenzoessäure (TIBA)**

2,3,5-Triiodobenzoessäure wurde mit einer Konzentration von 50 mM in DMSO gelöst und 1:500 im Nährmedium (MSS) verdünnt. Als Kontrolle diente Nährmedium (MSS) mit 0,2 % DMSO.

### **Methyljasmonat**

Methyljasmonat wurde mit Ethanol auf eine Konzentration von 0,5 M eingestellt und 1:10000 mit Nährmedium (MSS) verdünnt. Als Kontrolle diente Nährmedium (MSS) mit 0,01 % Ethanol.

### **12 – oxo – Phytodiensäure (OPDA)**

OPDA wurde mit Nährmedium (MSS) auf eine Konzentration von 75  $\mu$ M eingestellt. Als Kontrolle diente Nährmedium (MSS) mit 2 % Ethanol.

### **Leptomycin B (LMB)**

Leptomycin B wurde mit Nährmedium (MSS) auf eine Konzentration von 2 $\mu$ M eingestellt. Als Kontrolle diente Nährmedium (MSS) mit 0,2 % Ethanol.

### **Natriumchlorid (NaCl)**

Natriumchlorid wurde mit einer Konzentration von 5 M in Wasser gelöst und mit Nährmedium (MSS) auf eine Konzentration von 100 mM eingestellt. Als Kontrolle diente Nährmedium (MSS) ohne Zusätze.

### **Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>)**

Cadmiumchlorid wurde mit einer Konzentration von 100 mM in Wasser gelöst und mit Nährmedium (MSS) auf eine Konzentration von 250 µM eingestellt. Als Kontrolle diente Nährmedium (MSS) ohne Zusätze.

### **3.2.6.3 Behandlung von auf Erde angezogenen Pflanzen mit TIBA**

Vier Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene, Pflanzen wurden mit einer Lösung von 100 µM TIBA in Wasser besprüht, bis alle sichtbaren Pflanzenteile gleichmäßig benetzt waren, und mit einer durchsichtigen Haube abgedeckt. Die Ernte des Pflanzenmaterials erfolgte acht Stunden nach der Behandlung. Als Kontrolle diente 0,2 % DMSO in Wasser.

### **3.2.7 Transiente Luciferase Reporterassays in Protoplasten**

Für die Untersuchung der Aktivität eines Promotors eignen sich transiente Luciferase Reporterassays in Protoplasten. Hierfür werden die Protoplasten mit einer Glühkäferluciferase unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors (Reporterkonstrukt) und einem Effektorprotein unter der Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Eine durch das Effektorprotein hervorgerufene Aktivierung oder Reprimierung des Promotors kann über die gesteigerte oder verminderte Aktivität der Glühkäferluciferase gemessen werden. Zur Normalisierung dient eine Renillaluciferase unter der Kontrolle des *Ubiquitin10*-Promotors (Referenzkonstrukt).

#### **3.2.7.1 Protoplastierung von *A.thaliana* Blattgewebe**

Die Gewinnung von Protoplasten aus Blättern von 4 – 6 Wochen im Langtag angezogenen Pflanzen erfolgte nach der Methode von Sheen (Sheen 2001). Die Unterseite der Blätter wurde in ca. 2 mm Abständen mit einer Rasierklinge eingeritzt und die Blätter mit der Unterseite nach unten in eine Petrischale mit 10 mL Enzymlösung gelegt, ohne zu überlappen. Die Protoplasten aus einer komplett ausgefüllten Petrischale reichen für 48 Transformationsansätze. Nach dem Verdau der Zellwände durch die Enzyme der Enzymlösung über Nacht unter Anzuchtbedingungen wurden die Protoplasten durch Filtration durch ein Metallsieb (75 µm Maschengröße) von den Blattresten getrennt. Anschließend wurden die

Protoplasten für zwei Minuten bei 780 rpm und RT mit geringster Beschleunigungs- und Bremsstufe zentrifugiert. Die Enzymlösung wurde vorsichtig abgenommen und die Protoplasten mit 10 mL W5-Puffer gewaschen und zwei Minuten bei 780 rpm und RT mit geringster Beschleunigungs- und Bremsstufe zentrifugiert. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt und die Protoplasten anschließend für 4-6 Stunden in 10 mL W5-Puffer auf Eis inkubiert.

### **3.2.7.2 Transiente Transformation von *A.thaliana* Protoplasten**

Für die transiente Transformation der Protoplasten wurde der W5-Puffer von den abgesetzten Protoplasten vorsichtig abgenommen und die Protoplasten in 12 mL MMG-Puffer resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden zu 200 µL Protoplastenlösung 20 µL DNA-Lösung gegeben (1 µg Reporterkonstrukt, 1 µg Referenzkonstrukt, 7.5 µg Effektorkonstrukt in 20 µL H<sub>2</sub>O) und durch invertieren vermischt. Nach Zugabe von 220 µL PEG-Lösung und abermaligem Mischen folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 800 µL W5-Puffer durch Invertieren mit den Transformationsansätzen vermischt. Anschließend wurden die Transformationsansätze für zwei Minuten bei 780 rpm und RT mit geringster Beschleunigungs- und Bremsstufe zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Protoplasten in 250 µL WI-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht unter Anzuchtbedingungen.

### **3.2.7.3 Luciferase Reporterassay**

Die Messung der Luciferaseaktivität in den transformierten Protoplasten erfolgte unter Verwendung des *Dual-luciferase reporter assay*<sup>®</sup> Systems der Firma Promega mit dem *Centro XS<sup>3</sup> LB 960*<sup>®</sup> Mikrotiterplattenleser der Firma Berthold Technologies. Die transformierten Protoplasten wurden durch Zentrifugation für eine Minute bei 780 rpm und RT mit geringster Beschleunigungs- und Bremsstufe sedimentiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes mit einer Insulinspritze wurden die Protoplasten in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Zugabe von 20 µL 1x *passive lysis buffer* lysiert. Von den Lysaten wurden jeweils 3 µL in eine Vertiefung einer 384er Mikrotiterplatte gegeben und gemessen. Der Mikrotiterplattenleser wurde vor der Messung mit der erforderlichen Menge an Substratlösung für die verwendeten

Luciferasen beladen (LARII-Substrat für die Glühkäferluciferase und Stop+Glo 1:50 für die Renillaluciferase). Tabelle 3.6 zeigt das Ablaufschema einer Messung.

**Tabelle 3.6: Ablauf der Messung der Luciferaseaktivitäten in einem Transformationsansatz**

30 sek warten
Zugabe von 15 $\mu$ L LARII Substrat
5 sek warten
5 sek Messung der Aktivität der Glühkäferluciferase
Zugeben vom 15 $\mu$ L Stop+Glo Substrat
5 sek Warten
5 sek Messung der Aktivität der Renillaluciferase

### **3.2.7.4 Für die Protoplastierung und Transformation genutzte Puffer**

#### **W5-Puffer:**

154 mM NaCl  
 125 mM CaCl<sub>2</sub>  
 5 mM KCl  
 2 mM MES  
 ad 50 mL H<sub>2</sub>O

#### **WI-Puffer:**

0,5 M Mannitol  
 0,02 M KCl  
 0,004 M MES  
 ad 50 mL H<sub>2</sub>O

#### **MMg-Puffer:**

0,4 M Mannitol  
 0,015 M MgCl<sub>2</sub>  
 0,004 M MES  
 ad 50 mL H<sub>2</sub>O

**Enzymlösung:**

0,625 g Cellulase  
0,150 g Macerozym  
0,4 M Mannitol  
0,02 M KCl  
0,02 M MES  
0,01 M CaCl<sub>2</sub>  
ad 50 mL H<sub>2</sub>O

**PEG-Lösung (40 %)**

20 g PEG 4000  
14,16 mL H<sub>2</sub>O  
13,3 mL Mannitol (0,75 M Stock)  
5 mL CaCl<sub>2</sub> (1 M Stock)  
ad 50 mL H<sub>2</sub>O

**3.2.8 Hefe – Zwei – Hybrid – System**

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist ein System zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen (Fields & Song 1989). Hierbei wird einer der Interaktionspartner mit der DNA-Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* fusioniert (Köderprotein), der andere Interaktionspartner mit der Aktivierungsdomäne desselben Transkriptionsfaktors (Beuteprotein). Das Köderprotein kann aufgrund der angefügten DNA-Bindedomäne an den GAL-Promotor binden. Kommt es zu einer Interaktion mit dem Beuteprotein, werden die beiden Domänen der GAL4 Transkriptionsfaktors vereinigt und es kommt zur Aktivierung der Transkription. Befindet sich unter der Kontrolle des GAL-Promoters in der Hefe ein Reporterogen, kann über die Aktivierung dieses Reportergens die Interaktion von Köder- und Beuteprotein nachgewiesen werden. Durch die Verwendung einer cDNA-Bank für die Erstellung des Beutekonstrukts, kann auch nach völlig neuen Interaktionspartnern für ein gegebenes Köderprotein gesucht werden.

### 3.2.8.1 Transformation von Hefezellen

Die Transformation der Hefezellen erfolgte nach der Methode von Gietz und Woods (Gietz & Woods 2002). Zur Erzeugung von Kompetenten Hefezellen des Stammes PJ69-4a wurde eine 20 mL Hefekultur in YPAD-Medium angesetzt über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur verwendet, um eine 50 mL- Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 in YPAD-Medium anzusetzen. Diese Kultur wurde bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 2 aufwies. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000 rpm und RT geerntet und in 25 mL sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefezellen in 1 mL sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 Sekunden bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Hefezellen in einem Gesamtvolumen von 1 mL resuspendiert. Die Hefesuspension wurde in 10 100 µL Aliquots aufgeteilt, die Ansätze für 30 Sekunden bei 13000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Hefezellen in 355 µL Transformationsmix (Tab. 3.7) resuspendiert und in neue Reaktionsgefäße überführt, in die jeweils 0,5 µg des Köderplasmids und des Beuteplasmids in einem Gesamtvolumen von 5 µL vorgelegt wurden. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 30 °C erfolgte ein Hitzeschock für 40 Minuten bei 42 °C. Nach dem Hitzeschock wurden die Transformationsansätze für 1 Minute bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 1 mL sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf Selektions- und Interaktionsmedium ausplattiert.

**Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Transformationsmixes für einen Transformationsansatz.**

PEG 3500 50 % (w/v)	240 µL
Lithiumacetat 1 M	36 µL
erhitzte einzelstrang träger DNA	50 µL
H <sub>2</sub> O	29 µL
Gesamtvolumen	355 µL

### 3.2.8.2 Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität in Hefeextrakten (oNPG-Test)

Der oNPG-Test ist eine Methode zur Quantifizierung von Proteininteraktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Dabei wird das bakterielle *lacZ*-Gen, welches für eine β-Galactosidase kodiert, als Reporter gen verwendet. Dieses Enzym spaltet



normalerweise das Disaccharid Laktose, nimmt aber auch o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (oNPG) als Substrat an. oNPG ist ein farbloser Stoff, bei der Spaltung wird jedoch das gelbe o-Nitrophenol freigesetzt, welches bei einer Wellenlänge von 420 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Mittels der Formel

$$\frac{1000 * OD_{420}}{V * T * OD_{600} * F} \quad (V = \text{Volumen der Hefekultur, } T = \text{Reaktionszeit, } F =$$

Verdünnungsfaktor) kann die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt werden.

Für einen oNPG-Test wurde eine 3 mL Hefekultur in Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Aus 1,5 mL dieser Kultur wurden die Hefezellen durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm und RT geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Hefezellen mit 1 mL Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; pH7,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm und RT wurden die Hefezellen in 300  $\mu$ L Z-Puffer resuspendiert. Hiervon wurden 100  $\mu$ L in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden 700  $\mu$ L Z-Puffer mit 2,7  $\mu$ L  $\beta$ -Mercaptoethanol pro  $\mu$ L zugegeben. Nach Zugabe von 160  $\mu$ L oNPG-Lösung (Z-Puffer mit 4 mg/mL oNPG) folgte eine Inkubation für 30-60 Minuten bei 37 °C unter Schütteln. Nach Eintreten einer Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 400  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt und der Reaktionsansatz für 10 Minuten bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200  $\mu$ L für die Messung der OD<sub>420</sub> eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit 100  $\mu$ L Z-Puffer statt Hefelösung. Für die Normalisierung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurde die OD<sub>600</sub> der anfangs abgenommenen 200  $\mu$ L bestimmt.

### **3.2.9 Markierung von cysteinhaltigen Proteinen mit mPEG-Mal-5000**

Um den Redox-Status von Proteinen in Pflanzenzellen zu untersuchen wurden reduzierte Cysteine der Proteine mit Methoxypolyethylenglycol Maleimide-5000 (mPEG-Mal-5000) markiert. Durch das anfügen eines solchen Moleküls wird dem Molekulargewicht des Proteins eine Masse von 5 kDa hinzugefügt, was sich als Änderung der Laufhöhe in einem SDS-Polyacrylamidgel gegenüber einem unmarkierten Protein äußert. Die Markierung der Cysteine mit mPEG-Mal-5000 erfolgte nach der Methode von Muthuramalingam et al. (Muthuramalingam et al.

2010). Die verwendeten Pflanzen wurden für 10 Tage unter Langtagbedingungen im hydroponischen System angezogen und die Wurzeln für eine Stunde mit 1 mM SA behandelt. Sowohl von den SA-behandelten Pflanzen als von den Kontrollpflanzen wurden jeweils zwei Proben bearbeitet. Das geerntete Wurzelmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Ca. 50 µL Pflanzenpulver wurden in 200 µL 20% Trichloressigsäure (TCA) aufgenommen, gemischt und 30 Minuten bei -18 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C wurde das entstandene Pellet mit 500 µL 10% TCA gewaschen und für 2 Minuten bei 13000 und 4 °C zentrifugiert. Es folgten ein Waschschriff mit 250 µL 5% TCA und Zentrifugation für 2 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in 180 µL Reaktionspuffer (6 M Harnstoff; 200 mM Bis-Tris pH 6,5; 0,5 % (w/v) SDS; 10 mM EDTA) mit 100 mM N-Ethylmaleimide (NEM) aufgenommen und für 60 Minuten bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Das NEM diente als Schutzgruppe für bereits reduzierte Cysteine. Die Reaktion mit dem NEM wurde durch Zugabe von 180 µL 20% TCA gestoppt. Es folgten eine Inkubation für 30 Minuten bei -18 °C und eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und RT sowie eine Wiederholung der Waschschriffe mit 10% und 5% TCA. Von den SA-behandelten Proben und den Kontrollproben wurde jeweils eine durch Inkubation in 180 µL Reaktionspuffer mit 100 mM Dithiothreitol (DTT) für 60 Minuten bei 25 °C im Dunkeln reduziert, zu der jeweils anderen Probe wurde kein DTT hinzugegeben. Die Reduktionsreaktion wurde durch Zugabe von 180 µL 20% TCA gestoppt. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei -18 °C und eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C sowie die Wiederholung der Waschschriffe mit 10% und 5% TCA. Die Markierung der Proben mit mPEG-Mal-5000 erfolgte durch Zugabe von 180 µL Reaktionspuffer mit 5 mM mPEG-Mal-5000 und Inkubation für 60 Minuten bei 25 °C im Dunkeln. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 2 µL 1 M DTT. Abschließend wurden die Proben mit 180 µL 2xSDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Markierten Proteine wurden über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot visualisiert.

### **3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie**

Die mikroskopische Analyse der intrazellulären Lokalisation der GFP-SCL Fusionsproteine erfolgte mit dem konfokalen Lasermikroskop SP5 der Firma Leica. Die zu analysierenden Pflanzen wurden für 10 Tage unter Langtagbedingungen auf mit Nährmedium (MSS) beschichteten Objektträgern angezogen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass derselbe Bereich derselben Wurzel nach der Kontrollbehandlung und der Chemikalienbehandlung betrachtet werden konnte. Die Pflanzen wurden für die Kontrolle für 30 Minuten mit flüssigem Nährmedium ohne Zusätze bzw. mit dem entsprechenden Lösungsmittel versetzt überschichtet und Anschließend mikroskopiert. Nach Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte die Chemikalienbehandlung für 30 Minuten und die erneute Aufnahme des bereits nach der Kontrollbehandlung aufgenommenen Wurzelbereiches. Die Anregung des GFP erfolgte durch das Licht eines Argon Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm. Das vom GFP emittierte Licht wurde mit dem Detektor PMT1 im Wellenlängenbereich von 500 nm bis 540 nm detektiert.

### **3.2.11 Bestimmung von Wurzellängen**

Zur Bestimmung der Inhibition des Wurzelwachstums durch Salicylsäure wurden Pflanzen der Genotypen Col-0, *sc14/33* und *sc14/33 35S:HA-GFP-SCL14* für sechs Tage auf Schrägplatten mit Nährmedium (MSS) unter Langtagbedingungen angezogen. Die Pflanzen wurden auf neue Schrägplatten mit Nährmedium bzw. auf Schrägplatten mit Nährmedium, versetzt mit 100  $\mu$ M SA, umgesetzt und die Wurzellänge wurde gemessen. Nach weiteren sechs Tagen bei Langtagbedingungen wurde die Wurzellänge erneut gemessen und der Wurzelzuwachs auf SA, relativ zur Kontrolle, berechnet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Chemischer Stress induziert die Akkumulation von SCL14 in Zellkernen von *A. thaliana* Wurzelzellen**

Das GRAS-Protein SCL14 ist ein Transkriptionskoaktivator, der an der Regulation von Genen beteiligt ist, die Teil der pflanzlichen Entgiftungsmaschinerie sind, wie zum Beispiel Glutathion S-Transferasen und Cytochrom P450 Monooxygenasen (Fode et al. 2008). Der Mechanismus, der zur Aktivierung des SCL14 Proteins führt, ist bisher allerdings nicht bekannt. Fode et al. konnten mittels Chromatinimmunopräzipitation nachweisen, dass der Proteinkomplex aus SCL14 und TGA2 sowohl im uninduzierten als auch im induzierten Zustand an die Promotoren seiner Zielgene bindet (Fode et al. 2008). In Tabakprotoplasten ist SCL14 sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert. Nach der Behandlung der Protoplasten mit dem Kernexportinhibitor Leptomycin B (LMB) ist SCL14 ausschließlich im Zellkern zu finden (Fode et al. 2008), was auf einen konstanten Austausch von SCL14 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma schließen lässt. Um zu untersuchen, ob die Akkumulation des Proteins im Zellkern auch in *Arabidopsis* Pflanzen stattfindet, welche Stimuli die Akkumulation auslösen und ob diese eine Bedeutung bei seiner Regulation spielt, wurden transgene Pflanzen hergestellt, die ein HA-GFP-SCL14 Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus exprimieren (Abb. 4.1).

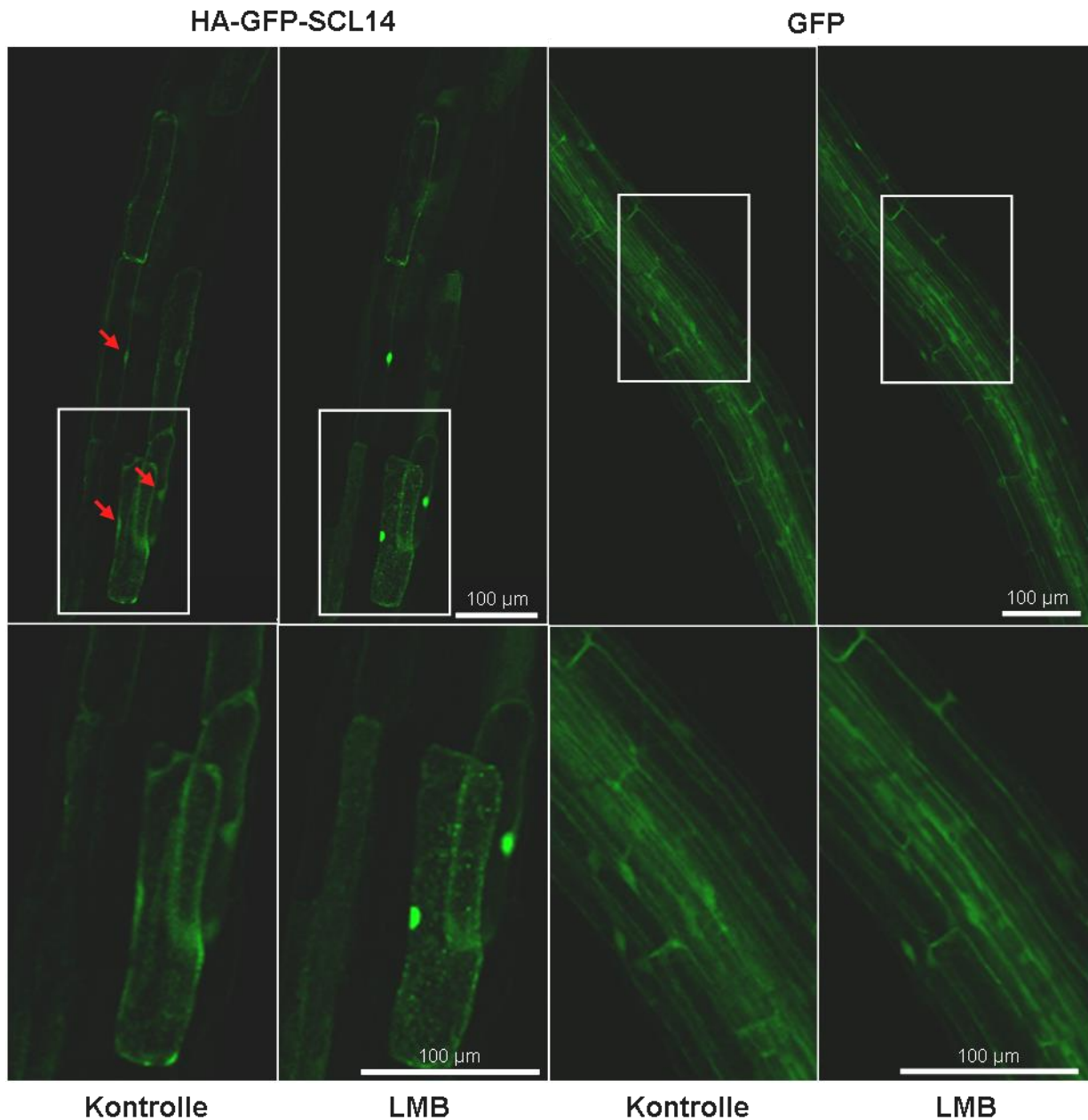
#### **4.1.1 Die Inhibition des Kernexports führt zur Akkumulation von SCL14 im Zellkern von *Arabidopsis* Wurzelzellen**

Da die Fluoreszenz des HA-GFP-SCL14 Konstruktes in oberirdischen Pflanzenteilen nur sehr schwach und nur in einzelnen Zellen zu detektieren war, wurde der Einfluss von chemischen Substanzen auf die Lokalisierung und die Aktivität von SCL14 in Wurzeln untersucht. Über die Wurzeln erfolgt die Aufnahme zahlreicher Toxine, wie Schwermetalle, Allelochemikalien und anthropogener Umweltgifte (Schützendübel & Polle 2002; Beynon et al. 2009). Um zu überprüfen, ob auch in Wurzeln ein konstanter Austausch von SCL14 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma stattfindet, wurden die Wurzeln mit 2  $\mu$ M LMB behandelt.



**Abbildung 4.1: Schema des HA-GFP-SCL14 Fusionsproteins, welches für die Lokalisationsstudien in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* verwendet wurde.**

Das GFP Signal in den HA-GFP-SCL14 exprimierenden Pflanzen ist in den Wurzeln nach der Kontrollbehandlung sowohl im Cytoplasma zu erkennen, als auch im Zellkern (Abb. 4.2). Nach der Behandlung der Wurzeln mit 2  $\mu$ M LMB kann immer noch ein GFP Signal im Cytoplasma der Zellen beobachtet werden, allerdings hat die Fluoreszenz im Zellkern gegenüber der Kontrollbehandlung zugenommen. Hier liegt ein Unterschied zu den Tabakprotoplasten vor, da sich in diesen die Fluoreszenz nach der LMB-Behandlung auf den Zellkern beschränkt. In Wurzeln von Pflanzen, die freies GFP exprimieren, findet keine Änderung in der Verteilung der Fluoreszenzintensität nach Behandlung der Wurzeln mit LMB im Vergleich zur Kontrollbehandlung statt (Abb. 4.2).

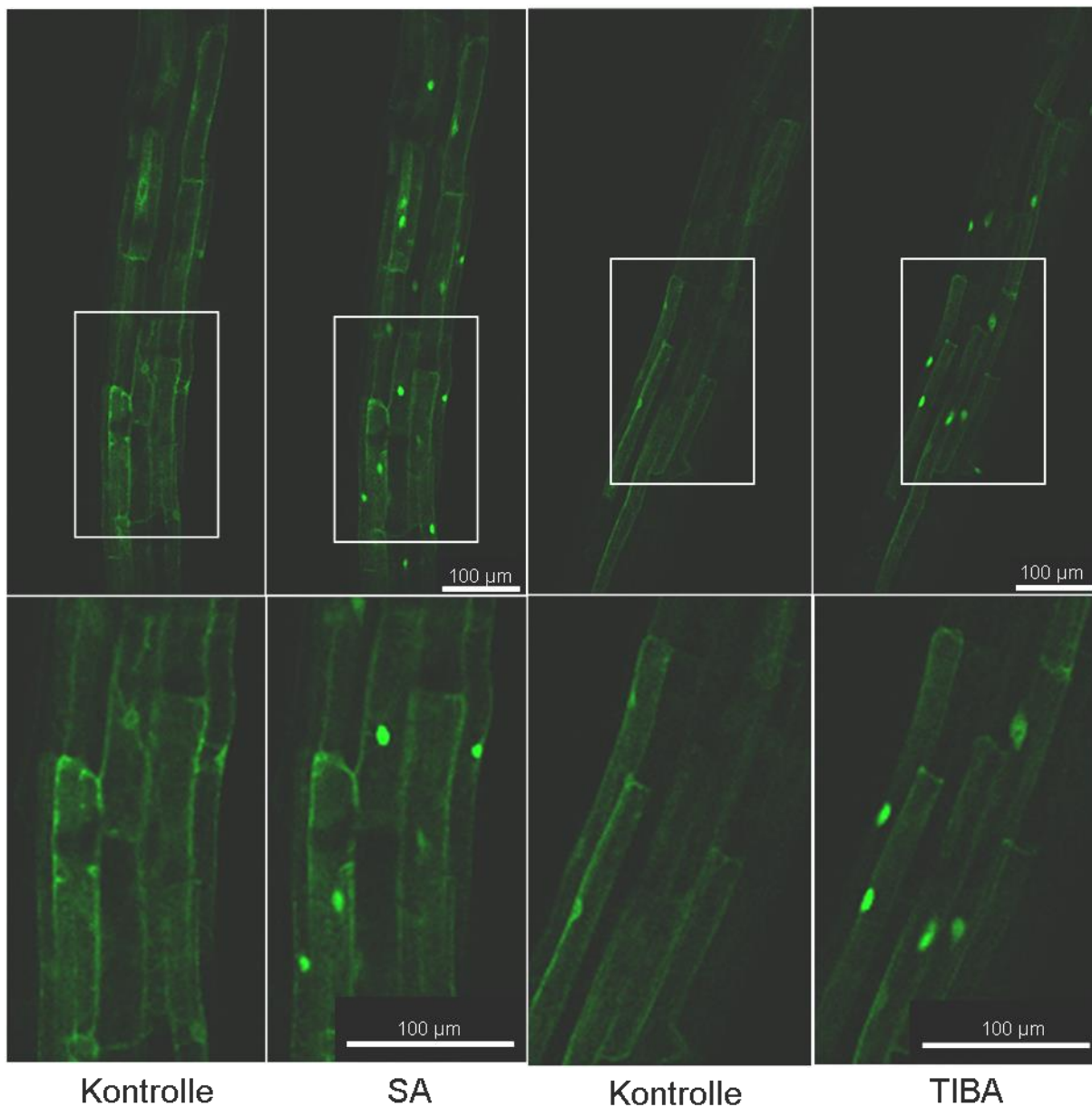


**Abbildung 4.2: HA-GFP-SCL14 akkumuliert in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzelzellen nach Behandlung mit Leptomycin B (LMB)**

10 Tage alte Pflanzen der Genotypen *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 und Col-0 35S:GFP wurden mit 2  $\mu$ M LMB behandelt. Als Kontrolle diente 0,2 % Ethanol. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf medienbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung wurden nacheinander an derselben Wurzel vorgenommen. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 min nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Replikaten. Die markierten Ausschnitte sind im unteren Bildteil vergrößert dargestellt.

#### **4.1.2 SCL14 akkumuliert im Zellkern nach der Behandlung von *Arabidopsis* Wurzeln mit Salicylsäure, 2,3,5-Triiodobenzoessäure und 12-oxo-Phytodiensäure**

Das Pflanzenhormon Salicylsäure (SA) und das Xenobiotikum 2,3,5-Triiodobenzoessäure (TIBA) aktivieren in Blättern die Transkription von SCL14 Zielgenen wie *GSTU7* und *CYP81D11* in Abhängigkeit von SCL14 (Fode et al. 2008). Um zu testen, ob diese Substanzen auch die Akkumulation von SCL14 im Zellkern induzieren, wurden Wurzeln von transgenen Pflanzen, die ein HA-GFP-SCL14 Fusionsprotein exprimieren, mit 1 mM SA bzw. 100  $\mu$ M TIBA behandelt. Sowohl nach der Behandlung der Pflanzen mit SA, als auch nach der Behandlung der Pflanzen mit TIBA ist eine Akkumulation von SCL14 im Zellkern zu beobachten (Abb. 4.3). Nach SA Behandlung nimmt die Fluoreszenz im Zellkern etwa auf das 8-fache zu, nach der Behandlung der Wurzeln mit TIBA etwa auf das 6-fache (Abb. 4.5). Sowohl SA als auch TIBA beeinflussen also den Austausch von SCL14 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma in ähnlicher Weise wie LMB.



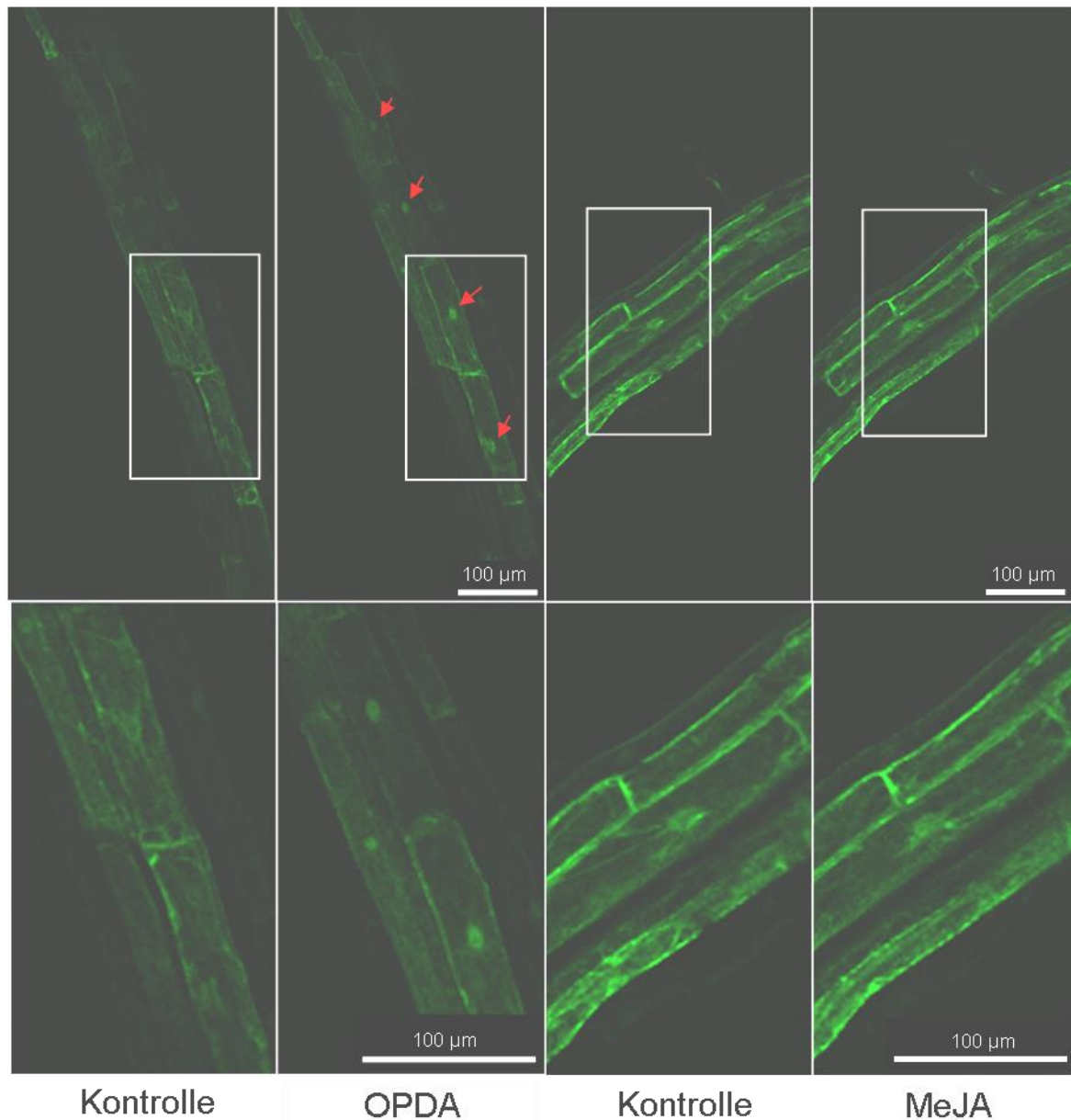
**Abbildung 4.3: HA-GFP-SCL14 akkumuliert in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzelzellen nach Behandlung mit Salicylsäure (SA) und 2,3,5-Triiodobenzoessäure**

10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 wurden mit 1 mM SA bzw. 100 µM TIBA behandelt. Als Kontrolle diente Wasser bzw. 0,2 % DMSO. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf mediumbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung wurden nacheinander an derselben Wurzel vorgenommen. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 min nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild von zwei unabhängigen Replikaten. Die markierten Ausschnitte sind im unteren Bildteil vergrößert dargestellt.

Eine weitere Substanz, die die Akkumulation von SCL14 im Zellkern induziert, ist das Oxilipin 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA), eine Vorstufe des Pflanzenhormons Jasmonsäure (JA) (Abb. 4.4). JA hat diese Wirkung jedoch nicht (Abb. 4.4), woraus sich schließen lässt, dass die Wirkung durch OPDA selbst hervorgerufen wird und nicht indirekt nach der Überführung in JA, bzw. das biologisch aktive Konjugat der



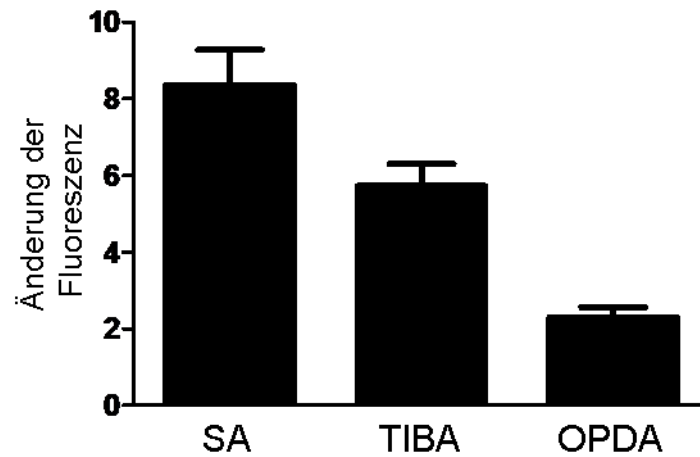
Jasmonsäure mit der Aminosäure Isoleucin (JA-Ile), durch den Stoffwechsel der Pflanze.



**Abbildung 4.4: HA-GFP-SCL14 akkumuliert in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln nach Behandlung mit 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA), jedoch nicht nach Behandlung mit Methyljasmonat (MeJA)**

10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 wurden mit 75 µM OPDA bzw. 50 µM MeJA behandelt. Als Kontrolle diente 0,01 % Ethanol. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf medienbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung erfolgten nacheinander an derselben Wurzel. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 Minuten nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild von drei unabhängigen Replikaten. Die markierten Ausschnitte sind im unteren Bildteil vergrößert dargestellt.

Der Effekt von OPDA ist jedoch schwächer als der von SA und TIBA, da nach der OPDA Behandlung der Wurzeln die Fluoreszenz in den Zellkernen nur auf etwa das 2-fache zunimmt (Abb. 4.5).



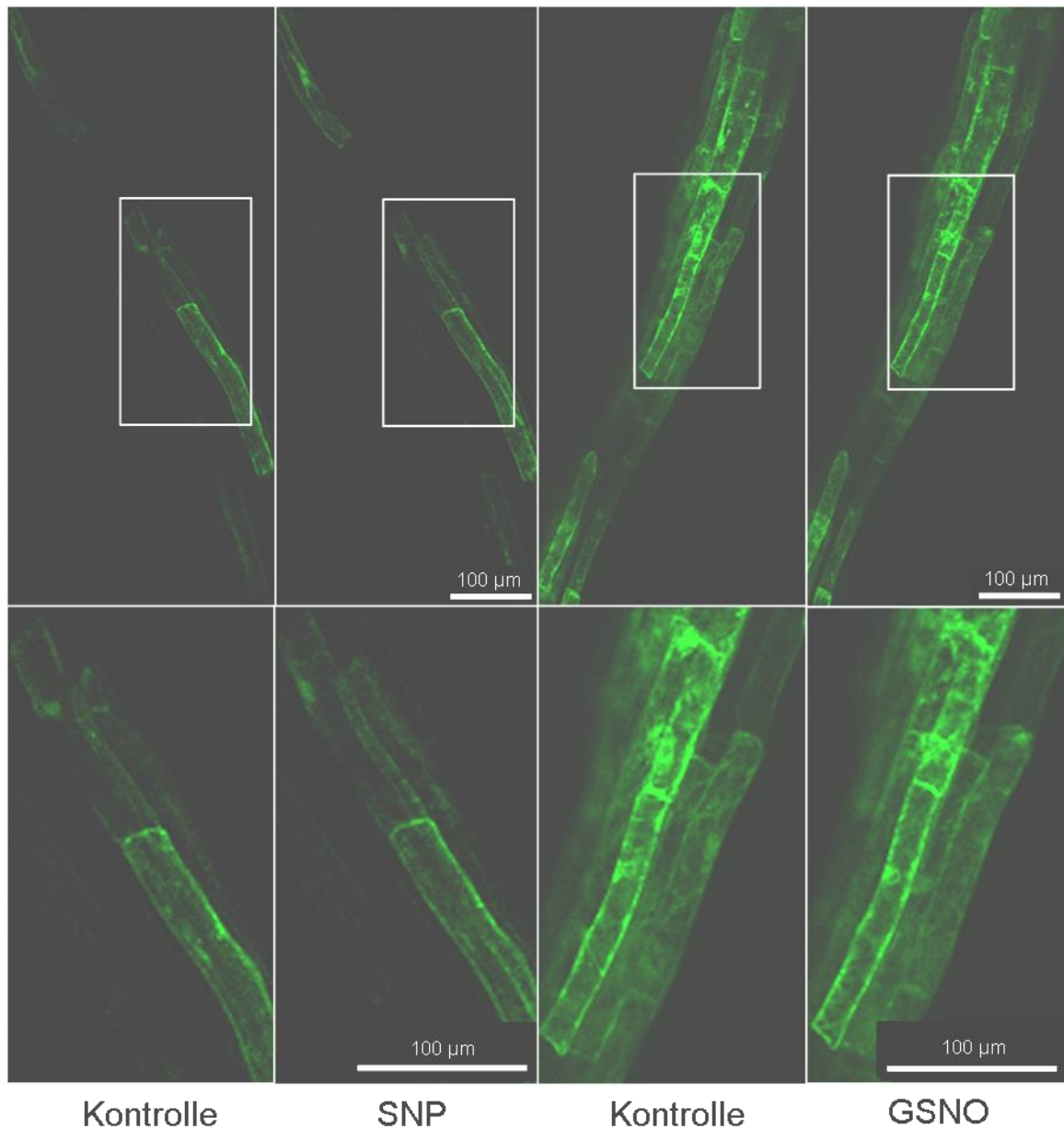
**Abbildung 4.5: Änderung der Intensität der Fluoreszenz in den Zellkernen SA-, TIBA- und OPDA- behandelter Wurzeln im Vergleich zur Kontrollbehandlung**

Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Programm Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite<sup>®</sup> der Firma Leica Microsystems CMS GmbH. Gezeigt ist der Mittelwert der Fluoreszenzänderung in 20-30 Kernen (SA und TIBA) bzw. 10 Kernen (OPDA) ( $\pm$  SEM) aus zwei unabhängig behandelten Wurzeln.

### **4.1.3 Die Stickstoffmonooxiddonatoren Natriumnitroprussid und S-Nitrosoglutathion induzieren nicht die Akkumulation von SCL14 im Zellkern**

In der *gsnor1-3* Mutante ist die Expression des SCL14 Zielgens *GSTU7*, zumindest in Blättern, hyperinduziert (Anhang Abb. 6.1). Dieser Mutante fehlt das Enzym S-Nitrosoglutathion Reduktase, sodass in diesen Pflanzen eine höhere Konzentration des NO-Donators S-Nitrosoglutathion (GSNO) im Vergleich zum Wildtyp vorliegt, was zu einer verstärkten Nitrosylierung der Proteine führt (Feechan et al. 2005). Bei der Nitrosylierung von Proteinen handelt es sich um die Oxydation der Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein durch Stickstoffmonooxid. Diese Modifikation spielt in Pflanzen beispielsweise eine Rolle bei der Regulation des Schlüsselregulators der systemischen erworbenen Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR) NONEXPRESSOR OF PR1 (NPR1) (Tada et al. 2008). Da es in der *gsnor1-3* Mutante unter bestimmten Bedingungen zu einer verstärkten Expression von SCL14 Zielgenen im Vergleich zum Wildtyp kommt, könnte die Nitrosylierung auch bei der Aktivierung von SCL14 eine Rolle spielen. Daher wurden *Arabidopsis* Wurzeln mit den NO-Donatoren GSNO und Natriumnitroprussid (SNP) behandelt.

Weder nach der Behandlung mit GSNO noch mit SNP erfolgt eine Akkumulation von SCL14 in den Zellkernen (Abb. 4.6). Sofern SCL14 durch die NO-Donatoren nitrosyliert wird, ist dies daher nicht der Stimulus, welcher die Akkumulation im Zellkern auslöst.



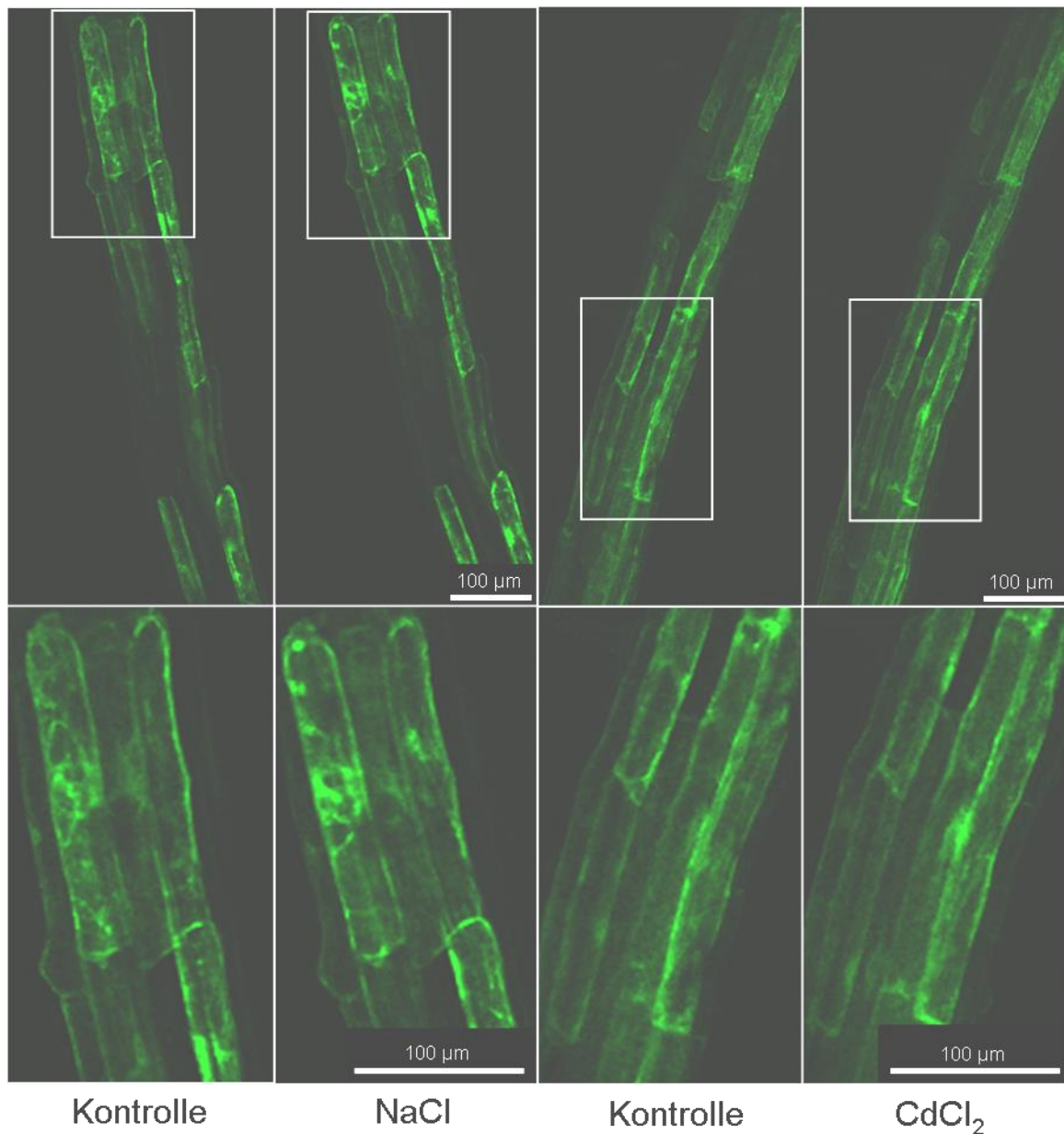
**Abbildung 4.6: HA-GFP-SCL14 akkumuliert nicht in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln nach der Behandlung mit den Stickstoffmonoxid Donatoren Natriumnitroprussid (SNP) und S-Nitrosoglutathion (GSNO)**

10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 wurden mit 200 µM SNP bzw. 100 µM GSNO behandelt. Als Kontrolle diente Wasser. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf medienbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung erfolgten nacheinander an derselben Wurzel. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 min nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Replikaten. Die markierten Ausschnitte sind im unteren Bildteil vergrößert dargestellt.

#### **4.1.4 NaCl und CdCl<sub>2</sub> induzieren nicht die Akkumulation von SCL14 im Zellkern**

Natriumchlorid und das Schwermetall Cadmium lösen in pflanzlichem Gewebe die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) aus (Borsani et al. 2001; Remans et al. 2010). Um zu untersuchen, ob die durch NaCl und CdCl<sub>2</sub> ausgelöste Produktion von ROS und der damit verbundene oxidative Stress zur Akkumulation von SCL14 im Zellkern führt, wurden *Arabidopsis* Wurzeln mit 100 mM NaCl bzw. 250 µM CdCl<sub>2</sub> behandelt.

Da unter diesen Bedingungen keine Änderung der Fluoreszenz in den Zellen zu erkennen ist (Abb. 4.7), kann gefolgert werden, dass es sowohl nach der Behandlung der Wurzeln mit NaCl als auch nach der Behandlung mit CdCl<sub>2</sub> nicht zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern kommt.

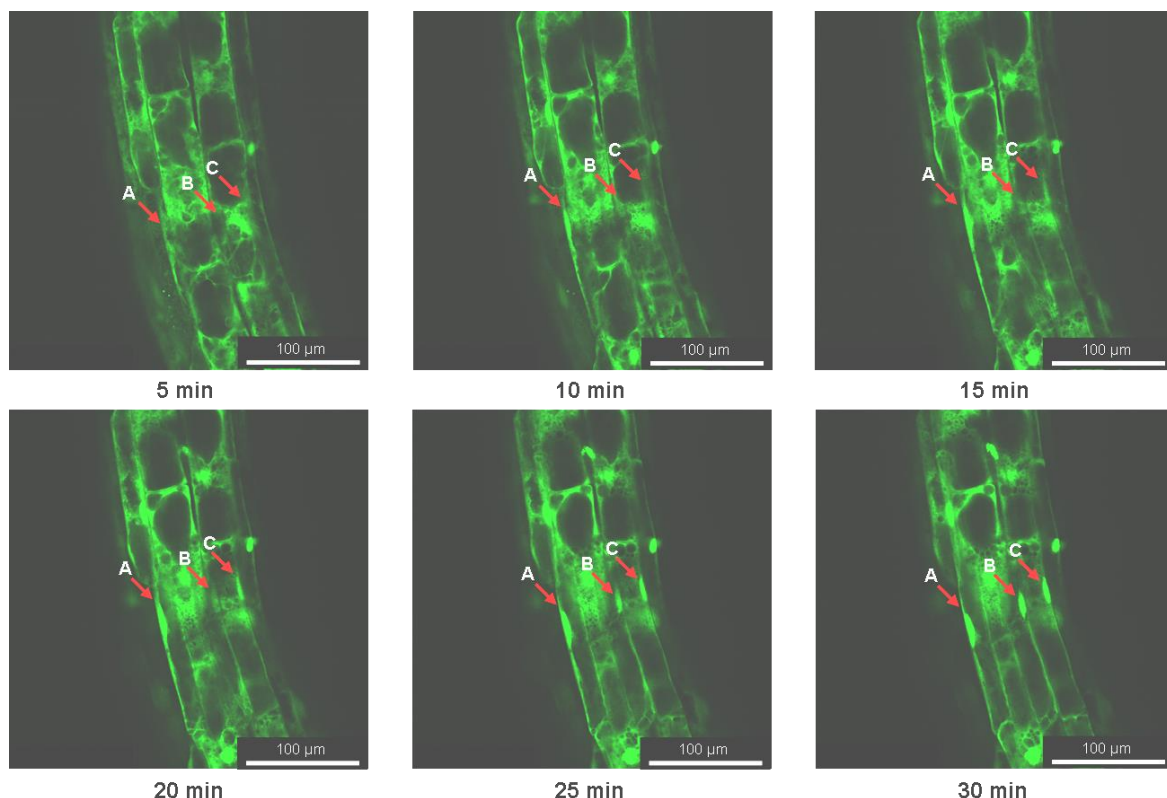


**Abbildung 4.7: HA-GFP-SCL14 akkumuliert nicht in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln nach der Behandlung mit Natriumchlorid (NaCl) und Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>).**

10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 wurden mit 100 mM NaCl bzw. 250  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> behandelt. Als Kontrolle diente Wasser. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf medienbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung erfolgten nacheinander an derselben Wurzel. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 min nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild von zwei Replikaten. Die markierten Ausschnitte sind im unteren Bildteil vergrößert dargestellt.

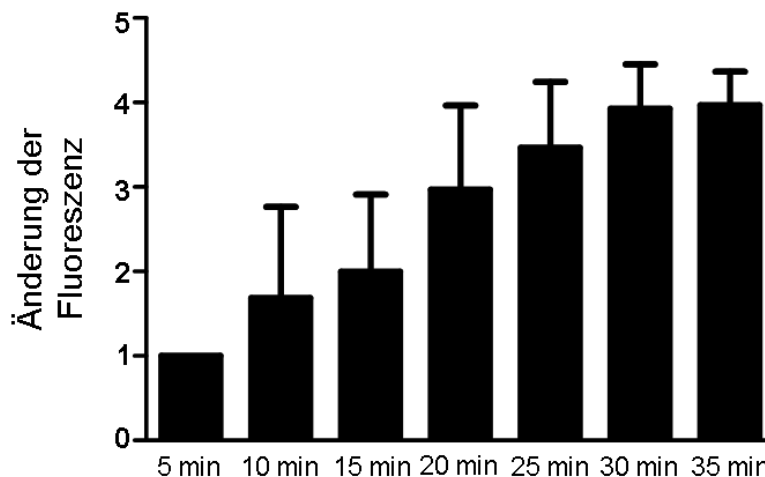
#### **4.1.5 Die Akkumulation von SCL14 im Zellkern ist 30 Minuten nach Beginn des Stimulus abgeschlossen**

Um die Kinetik der Akkumulation von SCL14 im Zellkern zu beobachten, wurde eine Wurzel mit 100  $\mu\text{M}$  TIBA behandelt. Über den Verlauf von 60 Minuten wurden im Abstand von fünf Minuten Bilder des gleichen Bereiches der Wurzel aufgenommen. Die erste Aufnahme erfolgte fünf Minuten nach Beginn der Behandlung. Die Fluoreszenz in den Zellkernen nimmt über die betrachtete Zeitdauer stetig zu (Abb. 4.8). Fünf Minuten nach Beginn des TIBA Stimulus ist noch keine Akkumulation der Fluoreszenz zu erkennen, jedoch ist bereits nach 10 Minuten eine Akkumulation sichtbar (A). Nach 20 bis 25 Minuten zeigt sich auch in weiteren Zellen ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz im Zellkern (B+C), welcher sich bis 30 Minuten nach Beginn des Stimulus fortsetzt. Darüber hinaus ist keine weitere Zunahme der Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten (Abb. 4.9). Die Akkumulation von SCL14 im Zellkern ist also nach etwa 30 Minuten abgeschlossen.



**Abbildung 4.8: Die Akkumulation von HA-GFP-SCL14 im Zellkern nach TIBA Behandlung ist nach 30 Minuten abgeschlossen.**

10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 wurden mit 100  $\mu\text{M}$  TIBA behandelt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril in Flüssigmedium in einer 12-Napf-Mikrotiterplatte. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte an derselben Wurzel in Abständen von fünf Minuten über einen Zeitraum von 60 Minuten nach Beginn der TIBA Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Replikaten.



**Abbildung 4.9: Zeitlicher Verlauf der Änderung der Fluoreszenz in Zellkernen von *Arabidopsis* Wurzeln.**

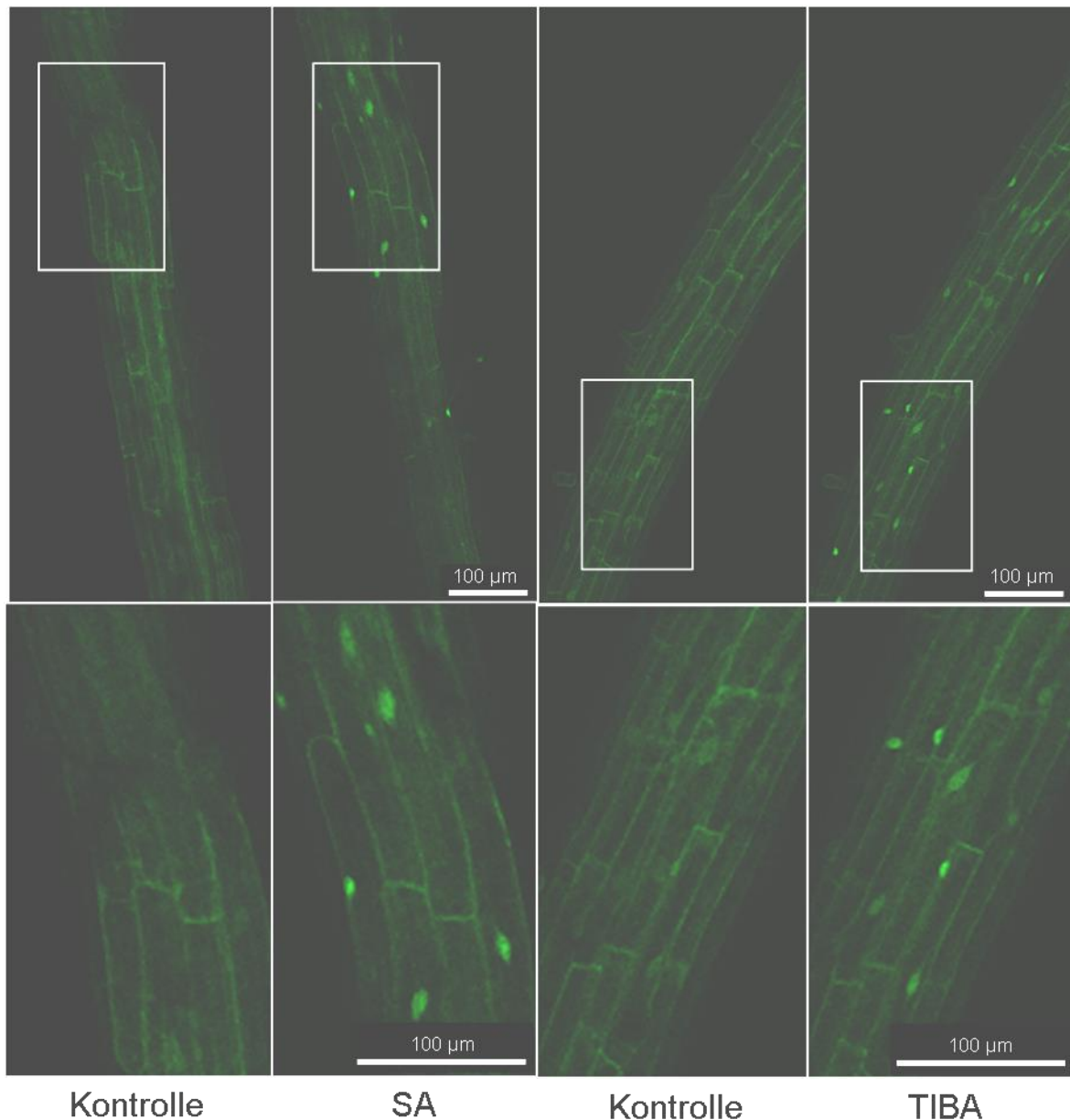
Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Programm ImageJ. Gezeigt ist die Änderung der Fluoreszenz in den in Abb. 1.8 markierten Zellkernen über den Verlauf von 35 Minuten nach TIBA-Behandlung (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Fluoreszenz in den Zellkernen fünf Minuten nach TIBA-Behandlung wurde als 1 definiert.

#### **4.1.6 Die Akkumulation von SCL14 im Zellkern ist unabhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II**

SCL14 interagiert mit dem bZIP Transkriptionsfaktor TGA2 und bildet mit diesem einen Aktivierungskomplex an den *as-1-ähnlichen* Elementen in den Promotoren der SCL14 Zielgene (Fode et al. 2008). Um zu überprüfen, ob diese Interaktion für die Akkumulation von SCL14 im Zellkern notwendig ist, wurde die *tga256* Mutante mit dem HA-GFP-SCL14 Konstrukt transformiert. In dieser Mutante sind neben *TGA2* auch die Gene der beiden anderen Klasse II TGA Transkriptionsfaktoren, *TGA5* und *TGA6*, deletiert.

Die transgenen Pflanzen wurden mit SA und TIBA behandelt, um die Kernakkumulation des HA-GFP-SCL14 Fusionsproteins zu induzieren. Sowohl nach der Behandlung der Pflanzen mit SA als auch nach der Behandlung mit TIBA akkumuliert HA-GFP-SCL14 in den Zellkernen der Wurzeln (Abb.4.10). Die TGA-Faktoren der Klasse II sind daher für die Akkumulation von SCL14 im Zellkern nicht erforderlich.





**Abbildung 4.10: HA-GFP-SCL14 akkumuliert auch in Abwesenheit der Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 nach der Behandlung mit SA und TIBA in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzeln.**

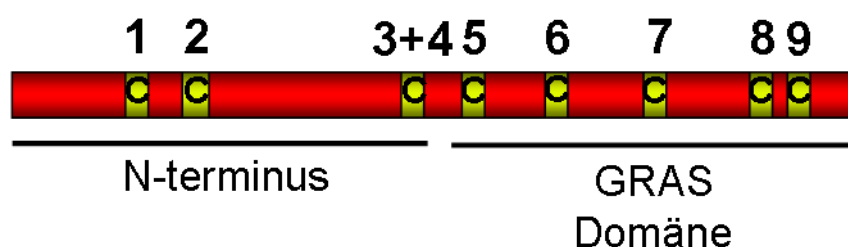
10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *tga256* 35S:HA-GFP-SCL wurden mit 1 mM SA bzw. 100 µM TIBA behandelt. Als Kontrolle diente Wasser bzw. 0,2 % DMSO. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf medienbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung erfolgten nacheinander an derselben Wurzel. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 min nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Replikaten.

## **4.2 Cysteine spielen eine Rolle für die Aktivität von SCL14**

Eine Möglichkeit der Modifikation von Proteinen durch oxidativen Stress ist die Oxidation der Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein (siehe Abschnitt 2.1.4). Eine Oxidation eines oder mehrerer der in SCL14 vorhandenen Cysteine könnte einen Mechanismus darstellen, der für die beobachtete Akkumulation von SCL14 im Zellkern von Wurzelzellen verantwortlich ist. Ein Protein, welches auf diese Weise reguliert wird und welches an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt ist, ist ein bZIP Transkriptionsfaktor der Hefe, YEAST ACTIVATOR PROTEIN 1 (YAP1p). Unter oxidativen Bedingungen bildet YAP1p zwei intramolekulare Disulfidbrücken aus, die zu einer Konformationsänderung des Proteins führen, wodurch der Kernexport von YAP1p verhindert wird (Wood et al. 2003). Eine ähnliche Regulation von SCL14 ist denkbar.

### **4.2.1 Die Cysteine C400 und C691 sind notwendig für die transkriptionsaktivierende Funktion von SCL14**

Um zu untersuchen, ob Cysteine bei der Regulation von SCL14 von Bedeutung sind, wurden mutierte Varianten des Proteins hergestellt, in denen neun Cysteine (Abb. 4.11) jeweils gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht wurden. Serin ist dem Cystein strukturell sehr ähnlich, wodurch die Sekundärstruktur des Proteins möglichst wenig beeinflusst werden soll, enthält in der Seitenkette statt eines Schwefelatoms jedoch ein Sauerstoffatom, welches nicht in gleicher Weise Reaktionen eingeht wie das Schwefelatom des Cysteins. Durch diese Mutationen soll ein Protein dargestellt werden, welches der Konformation eines reduzierten Proteins entspricht.



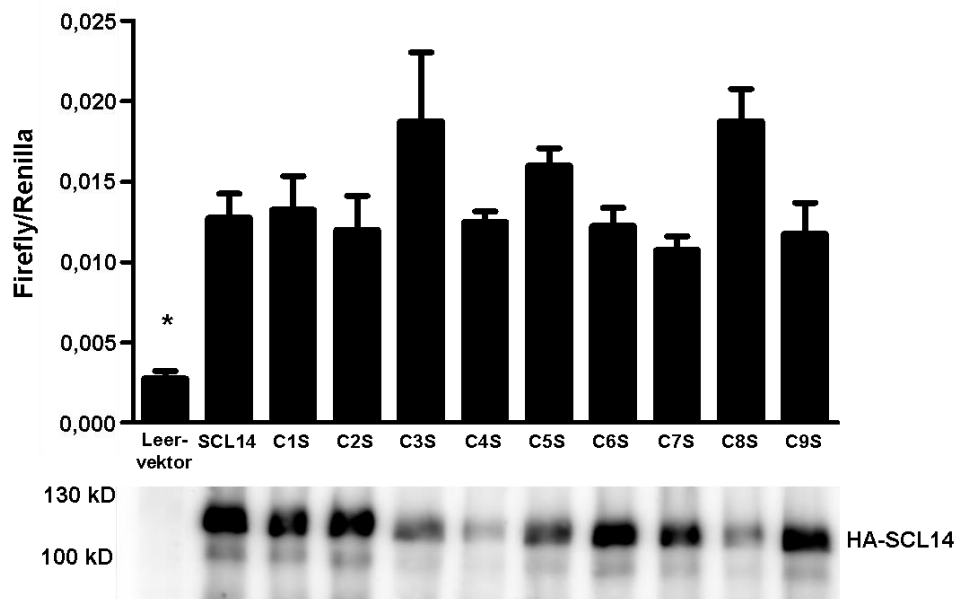
**Abbildung 4.11: Schema des SCL14 Proteins mit der Anordnung der neun enthaltenen Cysteine.**

1: C104; 2: C151; 3: C342; 4: C349; 5: C400; 6: C477; 7: C561; 8: C662; 9: C691

Die mutierten Proteine wurden als HA-Fusion transient in einem Protoplastensystem unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert und ihre Fähigkeit, den Promotor

des Gens *GSTU7* zu aktivieren, getestet. *GSTU7* wurde von Fode et al. als Zielgen von SCL14 identifiziert (Fode et al. 2008). Der Promotor des Gens enthält ein *as-1*-ähnliches Element, welches als Bindestelle für den SCL14/TGA-Komplex dienen kann.

Das SCL14 Wildtypprotein (SCL14) aktiviert in diesem System den *GSTU7*-Promotor ohne weiteren Stimulus (Abb. 4.12). Die mutierten Proteine (C1S – C9S) zeigen in diesem System keine signifikante Abweichung in der Aktivierung des *GSTU7*-Promotors.

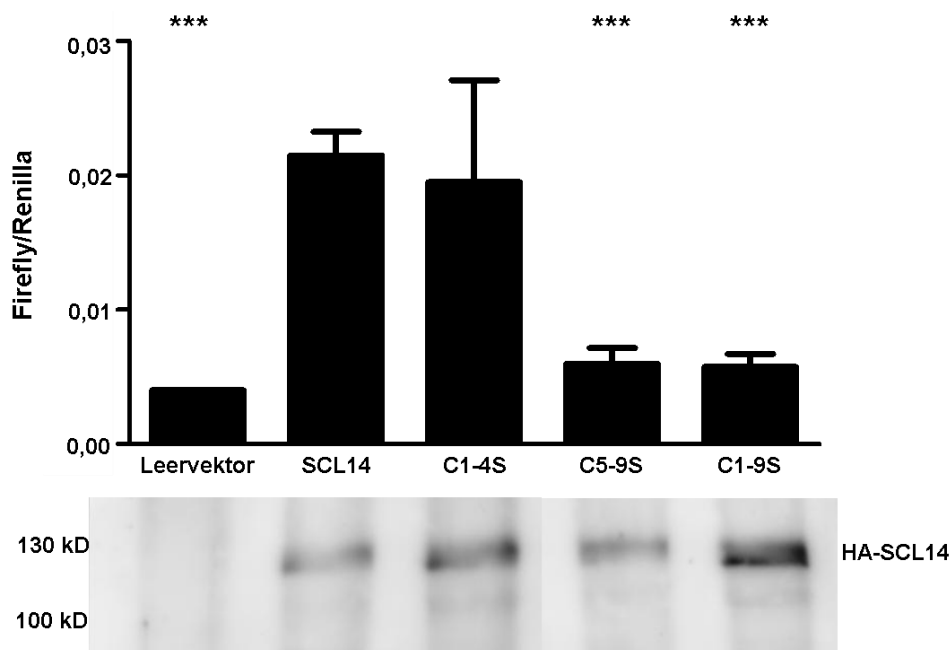


**Abbildung 4.12: Der Austausch von einzelnen Cysteinen gegen Serine hat keinen Effekt auf die Fähigkeit von SCL14, den *GSTU7* Promotor in Protoplasten zu aktivieren.**

Protoplasten aus Blattgewebe von 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Genotyps *scl14/33* wurden mit einer *Firefly* Luciferase unter der Kontrolle des *GSTU7*-Promotors und dem SCL14 Wildtypprotein bzw. den SCL14 Mutanten unter der Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Zur Normalisierung der Luciferasesignale diente eine Renillaluciferase unter der Kontrolle des *UBQ10*-Promotors. Gezeigt ist der Mittelwert von 4 Replikaten ( $\pm$  SEM) eines repräsentativen Experimentes. Sterne markieren einen signifikanten Unterschied in der Promotoraktivierung im Vergleich zur Promotoraktivierung durch SCL14 (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA). Die Detektion des SCL14 Proteins im Western Blot erfolgte mit einem gegen SCL14 gerichteten Antikörper.

Da der Austausch von einzelnen Cysteinen gegen Serin keinen Effekt auf die Aktivität des SCL14 Proteins hat, wurden Mehrfachmutanten hergestellt und ebenfalls transient im Protoplastensystem exprimiert. Es wurden drei unterschiedliche Mutanten getestet. Bei einer wurden die vier im N-Terminus befindlichen Cysteine gegen Serine ausgetauscht (C1-4S), in den weiteren Mutanten wurden die fünf in der GRAS-Domäne befindlichen Cysteine (C5-9S), bzw. alle neun Cysteine (C1-9S) gegen Serine ausgetauscht. Der Austausch der vier N-terminalen

Cysteine hat keinen Effekt auf die Aktivität von SCL14. Diese Mutante kann den *GSTU7*-Promotor in Protoplasten in gleichem Maße aktivieren wie das Wildtypprotein (Abb. 4.13). Im Gegensatz dazu führt die Mutation der fünf Cysteine der GRAS-Domäne zu einem vollständigen Verlust der Transkriptionsaktivatorfunktion von SCL14. Durch die Mutation aller neun Cysteine wird keine weitere Reduktion der Transkriptionsaktivatorfunktion von SCL14 hervorgerufen. Die für die Aktivität von SCL14 wichtigen Cysteine befinden sich daher innerhalb der GRAS-Domäne.

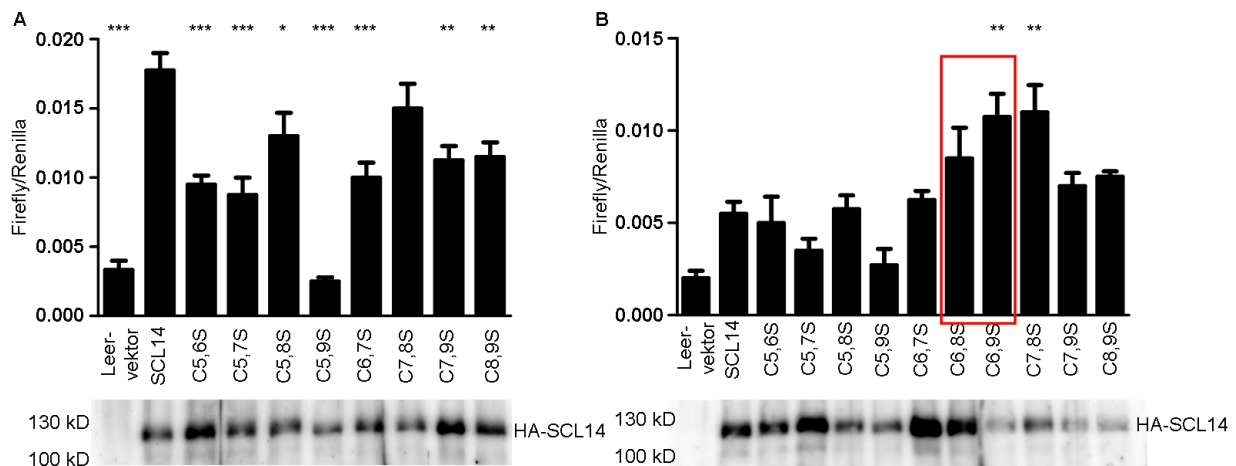


**Abbildung 4.13: Die Mutation der Cysteine in der GRAS-Domäne von SCL14 beeinträchtigt die Fähigkeit des Proteins, den *GSTU7*-Promotor in Protoplasten zu aktivieren.**

Protoplasten aus Blattgewebe von 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Genotyps *scl14/33* wurden mit einer *Firefly* Luciferase unter der Kontrolle des *GSTU7*-Promotors und dem SCL14 Wildtypprotein bzw. der SCL14C1-4S-, der SCL14C5-9S- oder der SCL14C1-9S Mutante unter der Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Zur Normalisierung der Luciferasesignale diente eine Renilla Luciferase unter der Kontrolle des *UBQ10*-Promotors. Gezeigt ist der Mittelwert von 4 Replikaten ( $\pm$  SEM) eines repräsentativen Experimentes. Sterne markieren einen signifikanten Unterschied in der Promotoraktivierung im Vergleich zur Promotoraktivierung durch SCL14 (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA). Die Detektion des SCL14 Proteins im Western Blot erfolgte mit einem gegen SCL14 gerichteten Antikörper.

Um die für die Aktivität von SCL14 kritischen Cysteine weiter eingrenzen zu können, wurden Doppelmutanten hergestellt, bei denen jeweils zwei der Cysteine in der GRAS-Domäne gegen Serine ausgetauscht wurden. In einem ersten Test war eine leichte Verringerung der Promotoraktivierung bei den meisten Mutanten im Vergleich zum SCL14 Wildtypprotein zu beobachten. Jedoch zeigte lediglich die Mutante, bei der Cystein 5 und Cystein 9 gegen Serine ausgetauscht wurden (C5,9S) einen vollständigen Verlust der Transkriptionsaktivatorfunktion (Abb. 4.14 A). In einem

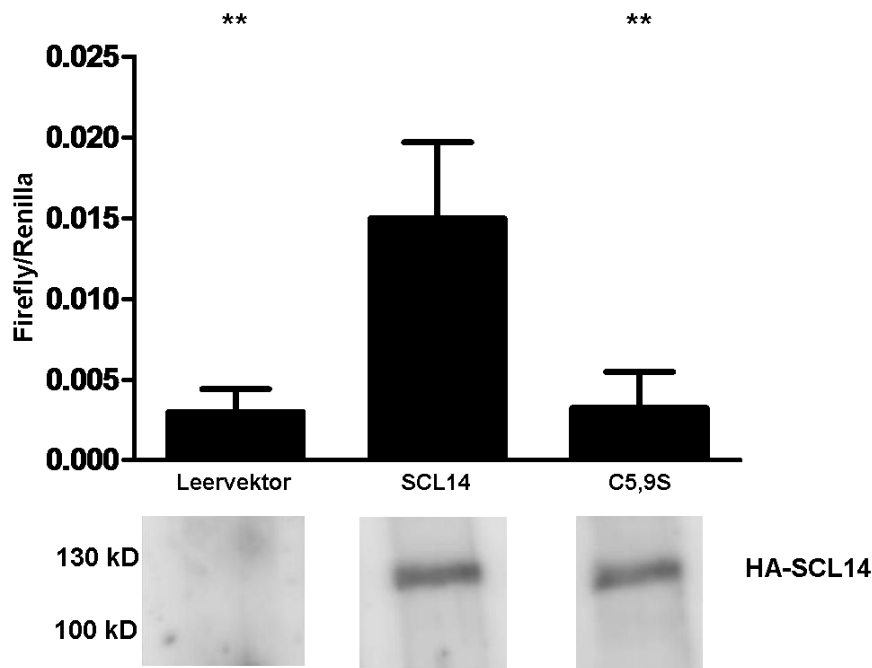
weiteren Experiment, in dem auch die beiden Mutanten C6,8S und C6,9S getestet wurden, ist die Aktivierung des *GSTU7*-Promotors durch SCL14 weniger stark ausgeprägt. Die beiden neuen Mutanten sind im Gegensatz zur C5,9S Mutante sogar stärker aktiv als das Wildtypprotein (Abb. 4.14 B). Daraus kann gefolgert werden, dass die gleichzeitige Mutation der Cysteine 6 und 8 bzw. der Cysteine 6 und 9 nicht zu einer Verringerung der Fähigkeit von SCL14 den *GSTU7*-Promotor zu aktivieren, führt.



**Abbildung 4.14: Die Doppelmutanten der Cysteine in der GRAS-Domäne von SCL14 verhalten sich, bis auf die C5,9S Mutante, in mehreren Experimenten nicht unterschiedlich in Bezug auf die Aktivierung des *GSTU7*-Promotors.**

Protoplasten aus Blattgewebe von 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Genotyps *scl14/33* wurden mit einer *Firefly* Luciferase unter der Kontrolle des *GSTU7*-Promotors und dem SCL14 Wildtypprotein bzw. der Doppelmutanten der Cysteine in der GRAS-Domäne (C6,7S und C6,8S nur in B (rote Markierung)) unter der Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Zur Normalisierung der Luciferasesignale diente eine Renilla Luciferase unter der Kontrolle des *UBQ10*-Promotors. Gezeigt ist der Mittelwert von 4 Replikaten ( $\pm$  SEM). Sterne markieren einen signifikanten Unterschied in der Promotoraktivierung im Vergleich zur Promotoraktivierung durch SCL14 (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA). Die Detektion des SCL14 Proteins im Western Blot erfolgte mit einem gegen SCL14 gerichteten Antikörper.

Der Funktionsverlust der C5,9S Mutante wurde in einem unabhängigen Experiment reproduziert (Abb. 4.15).



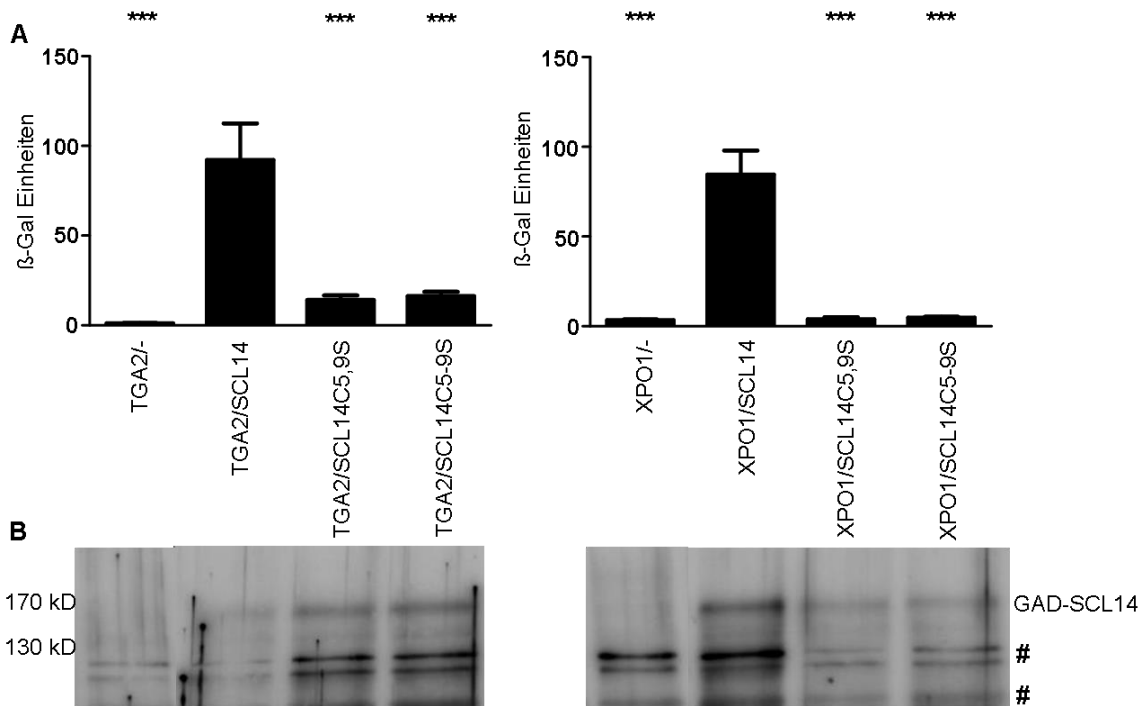
**Abbildung 4.15: Die Cysteine C400 (C5) und C691 (C9) sind essentiell für die Fähigkeit von SCL14, den *GSTU7*-Promotor zu aktivieren.**

Protoplasten aus Blattgewebe von 4 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Genotyps *sc14/33* wurden mit einer *Firefly* Luciferase unter der Kontrolle des *GSTU7*-Promotors und dem SCL14 Wildtypprotein bzw. der SCL14C5,9S Mutante unter der Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Zur Normalisierung der Luciferasesignale diente eine Renilla Luciferase unter der Kontrolle des *UBQ10*-Promotors. Gezeigt ist der Mittelwert von 4 Replikaten ( $\pm$  SEM) eines repräsentativen Experimentes. Sterne markieren einen signifikanten Unterschied in der Promotoraktivierung im Vergleich zur Promotoraktivierung durch SCL14 (\*\*:  $p \leq 0,01$ ; One-way ANOVA). Die Detektion des SCL14 Proteins im Western Blot erfolgte mit einem gegen SCL14 gerichteten Antikörper.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die beiden Cysteine an Position 400 (C5) und an Position 691 (C9) wichtig für die die Transkription stimulierende Aktivität von SCL14 sind. Da beide Cysteine mutiert werden müssen, um einen Effekt auf die Aktivität von SCL14 zu erreichen, ist es unwahrscheinlich, dass eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Aminosäuren ausgebildet wird. Auch die Ausbildung von zwei redundanten Disulfidbrücken ist unwahrscheinlich, da dann eine weitere Doppelmutante den gleichen Aktivitätsverlust hätte zeigen müssen, wie die C5,9S-Mutante. Wahrscheinlicher ist, dass eine andere oxidative Modifikation, wie zum Beispiel eine Sulphenierung oder eine Glutathionylierung, an einer der beiden Aminosäuren vorhanden sein muss.

#### **4.2.2 Die Cysteine 400 (C5) und 691 (C9) sind essentiell für die Interaktion von SCL14 mit TGA2 und XPO1a**

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde die Interaktion der beiden SCL14 Mutanten SCL14C5,9S und SCL14C5-9S mit TGA2 und dem Kernexportrezeptor XPO1a getestet. Hiefür wurde der Hefestamm PJ69-4A mit Fusionsproteinen aus der GAL4 DNA-Bindedomäne mit TGA2 (BD-TGA2) beziehungsweise XPO1a (BD-XPO1a) und Fusionsproteinen aus der GAL4 Aktivierungsdomäne mit SCL14 (GAD-SCL14) beziehungsweise den beiden mutierten Proteinen (GAD-SCL14C5,9S; GAD-SCL14C5-9S) transformiert. Die Stärke der Interaktionen wurde in einem oNPG-Test gemessen (Abb. 4.16 A) und die Expression von SCL14, SCL14C5,9S und SCL14C5-9S mittels Westernblotanalyse überprüft (Abb. 4.16 B). Das SCL14 Wildtypprotein interagiert in diesem Experiment sowohl mit TGA2 als auch mit XPO1a. Den mutierten Proteinen ist jedoch die Fähigkeit zur Interaktion, sowohl mit TGA2 als auch mit XPO1a, verloren gegangen. Die Interaktion von SCL14 mit TGA2 und XPO1a findet jedoch nicht an der GRAS-Domäne, sondern ausschließlich am N-Terminus von SCL14 statt (Fode et al. 2008)(J. Oberdiek; unveröffentlichte Daten). Daher scheint die Mutation der beiden Cysteine C400 und C691 eine starke Auswirkung auf die Konformation des Proteins zu haben, da hierdurch domänenübergreifend die Funktion des Proteins beeinflusst wird.



**Abbildung 4.16: oNPG-Test zur Quantifizierung der Interaktion von SCL14, SCL14C5,9S und SCL14C5-9S mit TGA2 und XPO1a im Hefe-Zwei-Hybrid-System.**

Die Transformation der Hefe erfolgte mit SCL14, SCL14C5,9S und SCL14C5-9S im Plasmid pDESTGAD sowie TGA2 bzw. XPO1a im Plasmid pDESTGBKT7. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Hefeklonen ( $\pm$  SEM). Sterne markieren einen signifikanten Unterschied in der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zur  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Hefen, transformiert mit SCL14 (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA). Der Nachweis der SCL14 Varianten im Western Blot erfolgte mit einem gegen SCL14 gerichteten Antikörper. Die Rauten markieren unspezifische Banden, die sowohl in Proteinextrakten aus Transformierten als auch aus untransformierten Hefen auftreten.

### **4.2.3 Die Cysteine C400 und C691 sind innerhalb der nächsten Verwandten von SCL14 konserviert**

SCL14 wird phylogenetisch mit seinen nächsten Verwandten innerhalb der Familie der GRAS-Transkriptionsfaktoren SCL9, SCL11, SCL30, SCL31, SCL33a und SCL33b zum SCL9 Zweig zusammengefasst (Abb. 2.3). Bei einem Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen dieser Proteine wird deutlich, dass die beiden Cysteine, die sich im SCL14 Protein an den Positionen 400 und 691 befinden, in allen sieben Proteinen konserviert sind. Zusätzlich befinden sich beide Cysteine in einer konservierten Region (Abb. 4.17). In Sequenz 1 befinden sich an den Positionen +1 und +2 ein Alanin und ein Glutamin, in Sequenz 2 an Position +1 ein Glutamat. Zusätzlich befindet sich in Sequenz 1 an Position -3, relativ zum Cystein, ein konserviertes Leucin, in Sequenz 2 an Position +5 ein konserviertes Arginin.



Möglicherweise sind neben den beiden Cysteinen auch die anderen konservierten Aminosäuren in diesen beiden Regionen für die Aktivität der Proteine notwendig.

Sequenz 1		Sequenz 2	
SCL9:	347 LLIHCAQAVA 356	SCL9:	635 NVIACEGWER 644
SCL11:	227 LLTQCAQAVA 236	SCL11:	520 SVISCEGAER 529
SCL14:	396 LLVLCQAQAVS 405	SCL14:	687 NNVACEGTER 696
SCL30:	212 LLMQCAQAVA 221	SCL30:	501 SVIACEGSER 510
SCL31:	318 LLTLCAQSVS 327	SCL31:	614 NVIACEGVDR 623
SCL33a:	321 MLVSCQAQAVS 330	SCL33a:	613 NVVACEGTER 622
SCL33b:	252 LLTHCAQAIS 261	SCL33b:	549 NVIACEEADR 558

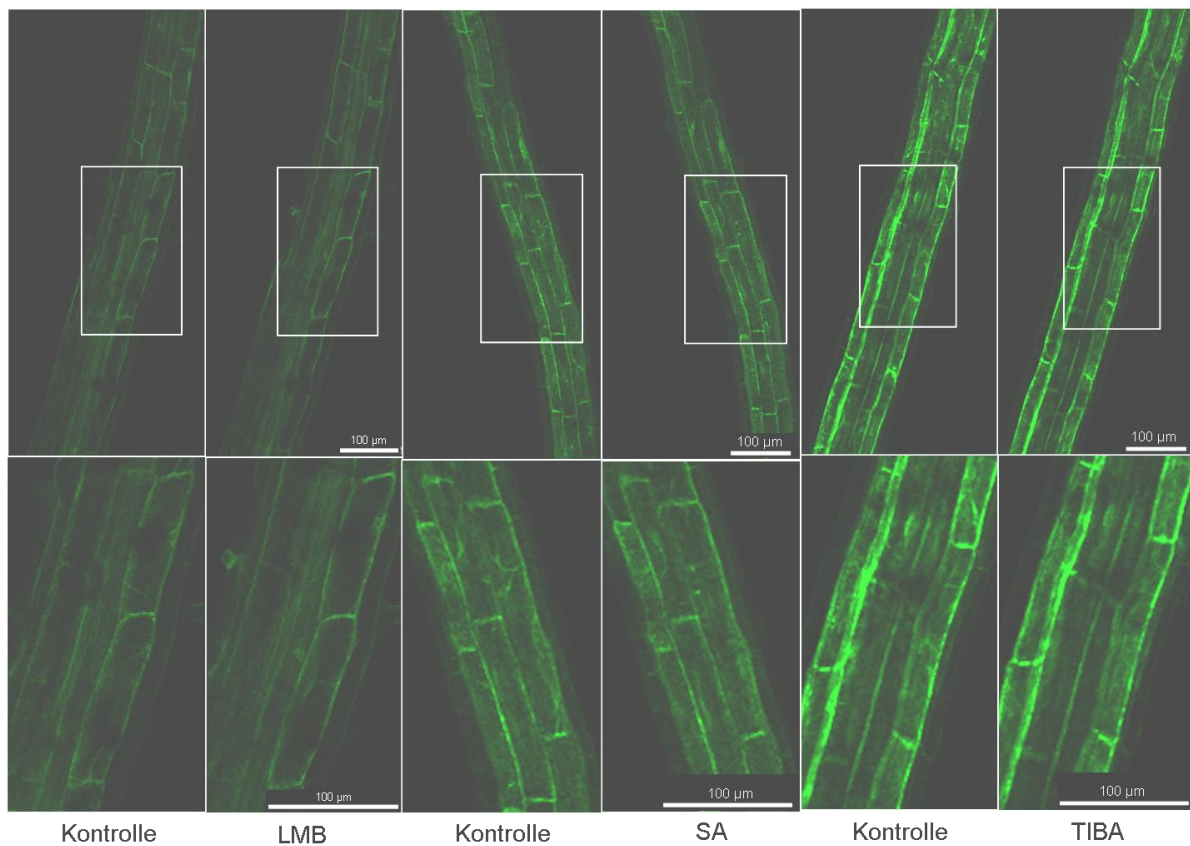
**Abbildung 4.17: Aminosäureumgebung der beiden in allen Mitgliedern des SCL9 Zweiges konservierten Cysteine.** Konservierte Aminosäuren sind in rot dargestellt.

#### **4.2.4 Die Cysteine in der GRAS-Domäne von SCL14 sind notwendig für die Akkumulation des Proteins im Zellkern**

Da die Cysteine in der GRAS-Domäne wichtig für die Aktivität von SCL14 sind, wurde überprüft, ob sich der Austausch dieser Aminosäuren auch auf die Akkumulation des Proteins im Zellkern nach chemischem Stress auswirkt. Hierfür wurden *sc14/33* Pflanzen mit einem HA-GFP-SCL14C5-9S Fusionsprotein unter der Kontrolle des 35S-Promotors transformiert. Die transgenen Pflanzen wurden mit LMB, SA und TIBA behandelt und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht.

Die intrazelluläre Lokalisation von HA-GFP-SCL14C5-9S unterscheidet sich bereits im uninduzierten Zustand von der des Wildtypproteins. Während das Wildtypprotein teilweise bereits in den unbehandelten Wurzeln innerhalb der Zellkerne zu sehen ist (siehe Abbildungen in den Abschnitten 4.1.1 – 4.1.6), kann diese Beobachtung für die Mutante nicht gemacht werden. Weiterhin erfolgt keine Akkumulation von HA-GFP-SCL14C5-9S nach der Behandlung der Pflanzen mit 2 µM LMB, 1 mM SA oder 100 µM TIBA (Abb. 4.18). Die Akkumulation des mutierten Proteins kann also weder durch die Inhibition des Kernexports durch LMB, noch durch die Wirkung von SA oder TIBA induziert werden. Dies lässt, zusammen mit der Beobachtung, dass keine basalen Mengen von HA-GFP-SCL14C5-9S im Zellkern vorhanden zu sein scheinen, den Schluss zu, dass sich die Mutation der Cysteine in der GRAS-Domäne bereits

auf den Kernimport auswirkt. Offensichtlich ist das die reduzierte Form repräsentierende SCL14 in allen getesteten Funktionen inaktiv.



**Abbildung 4.18: HA-GFP-SCL14C5-9S akkumuliert nach chemischem Stimulus nicht im Zellkern von *Arabidopsis thaliana* Wurzelzellen.**

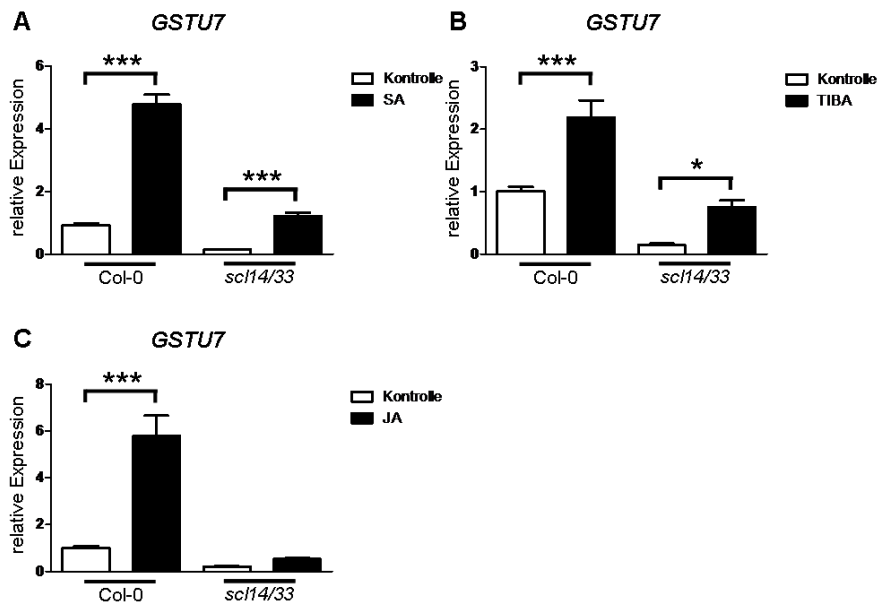
10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33 35S:HA-GFP-SCLC5-9S* wurden mit 2 µM LMB, 1 mM SA bzw. 100 µM TIBA behandelt. Als Kontrolle diente 0,2 % EtOH, Wasser bzw. 0,2 % DMSO. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril auf mediumbeschichteten Objektträgern unter Langtagbedingungen. Die Kontrollbehandlung und die Chemikalienbehandlung erfolgten nacheinander an derselben Wurzel. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte jeweils 30 min nach Beginn der Behandlung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Replikaten. Die markierten Ausschnitte sind im unteren Bildteil vergrößert dargestellt.

### **4.3 Analyse und Identifikation von SCL14 Zielgenen in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* nach chemischem Stress**

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit SA und TIBA eine Akkumulation von SCL14 im Zellkern von Wurzeln stattfindet, während dies nach der Behandlung mit MeJA nicht der Fall ist (Abschnitt 4.1). Um die biologische Relevanz dieser Akkumulation zu untersuchen, wurde die Wirkung von SA, TIBA und MeJA auf die Expression von SCL14 Zielgenen mittels quantitativer RealTime PCR (qRT-PCR) untersucht. Außerdem wurde eine Microarray Analyse mit SA-behandelten Wildtyp- und *sc14/33*-Pflanzen durchgeführt, um neue Zielgene von SCL14 zu finden.

#### **4.3.1 Die Aktivierung des SCL14 Zielgenes *GSTU7* erfolgt in Wurzeln von *Arabidopsis* durch SA und TIBA**

Bei den bisher untersuchten Zielgenen von SCL14 handelt es sich um Gene, die im Prozess der Detoxifikation giftiger Substanzen eine Rolle spielen, wie Cytochrom P450 Monooxygenasen, Glutathion S-Transferasen (GSTs) oder UDP-Glycosyltransferasen (UGTs). Diese Gene, wie beispielsweise die Glutathion S-Transferase *GSTU7*, werden durch die Einwirkung von Xenobiotika wie TIBA in Blättern SCL14-abhängig aktiviert (Fode et al. 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SCL14-abhängige Aktivierung von *GSTU7* auch in Wurzeln durch TIBA sowie durch SA und JA erfolgt (Abb. 4.19). Allerdings scheint SCL14 in Wurzeln bei der Aktivierung dieser Gene nicht der hauptsächliche Regulator zu sein, sondern nur verstärkende Funktion zu haben, da auch in der *sc14/33* Doppelmutante eine Aktivierung von *GSTU7* nach der Behandlung der Pflanzen mit SA oder TIBA zu beobachten ist. Zwar ist die absolute Expression der Gene, sowohl im uninduzierten als auch im induzierten Zustand, geringer als im Wildtyp, die relative Stärke der Induktion ist jedoch in beiden Genotypen gleich.



**Abbildung 4.19: Expression des SCL14 Zielgens *GSTU7* nach SA-, TIBA- und JA-Behandlung**

Die Behandlung mit 1 mM SA, 100  $\mu$ M TIBA bzw. 50  $\mu$ M JA erfolgte für vier Stunden an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Die Extraktion der RNA erfolgte aus Wurzelmaterial. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 13 – 15 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängigen Experimenten. (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

Um Gene zu finden, deren induzierbare Expression SCL14-abhängig ist, das heißt Gene, deren basale Expression in der Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, nicht reduziert ist und die in der Mutante nicht induziert werden, wurde eine Microarray Analyse durchgeführt. Für diese Analyse wurden Pflanzen der Genotypen Col-0 und *scl14/33* für 10 Tage in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogen und für eine Stunde mit 1 mM SA behandelt. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig wiederholt. Aus dem geernteten Wurzelmaterial wurde RNA für die Analyse extrahiert. Die Durchführung der Microarray Analyse erfolgte durch das Transkriptomanalyselabor der Universität Göttingen. Es wurde der GeneChip® Gene 1.0 ST der Firma Affymetrix verwendet.

### **4.3.2 Microarray-Analyse der Expression von SCL14 Zielgenen in Wurzeln nach Behandlung mit SA**

Die Expressionsmuster der Gene, die durch SA in einem der beiden Genotypen Col-0 oder *sc14/33* mindestens zweifach ( $p \leq 0,05$ ) induziert oder reprimiert wurden, erfolgte mit dem Programm MarVis (Kaefer et al. 2009). Das Computer Programm MarVis gruppiert Gene mit ähnlichem Expressionsmuster in Prototypen ein und kodiert farblich die relative Expression der Gene unter den unterschiedlichen Bedingungen. Die funktionelle Einordnung erfolgte anhand von Genontologien mit agriGO (Du et al. 2010). Durch SA wurde die Expression von 516 Genen in mindestens einem der beiden Genotypen positiv oder negativ beeinflusst (Anhang Tab. 6.6). Diese Gene ließen sich nach der Analyse mit MarVis anhand ihres Expressionsmusters in sieben Gruppen einteilen (A-G; Abb. 4.20).

Die erste Gruppe (A) enthält 64 Gene, deren Expression in Col-0 durch SA induziert wurde, in der *sc14/33* Mutante jedoch nicht. Hier finden sich viele Gene, die der zweiten Stufe des pflanzlichen Detoxifikationssystems zugeordnet werden können, wie GSTs und UGTs. Ebenso wurden das Glutaredoxin *ROXY19*, welches mit TGA-Faktoren interagiert, als auch mehrere NAC-Transkriptionsfaktoren in diese Gruppe eingeordnet. Darunter die beiden NAC-Faktoren *ATAF1* und *NAC032*, welche bereits von Fode et al. als Zielgene von SCL14 identifiziert werden konnten (Fode et al. 2008) und die von Neena Ratnakaran in ihrer Doktorarbeit als an der Regulation des Detoxifikationsprogrammes beteiligte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten (Ratnakaran 2014). Zwei weitere Gene des pflanzlichen Detoxifikationsprogrammes, die in diese Gruppe eingeordnet wurden, sind die Oxophytodiensäure Reduktasen 1 und 2 (*OPR1* und *OPR2*). Für diese beiden Enzyme konnte eine Funktion bei der Entgiftung des Xenobiotikums 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) nachgewiesen werden (Beynon et al. 2009).

In der zweiten Gruppe (B) finden sich Gene, die sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante durch SA gleichermaßen induziert werden, deren Expression daher nicht abhängig von SCL14 oder SCL33 ist. In dieser Gruppe fand sich keine signifikante Anreicherung von Genen, die einer bestimmten Genontologie zugeordnet werden konnten.

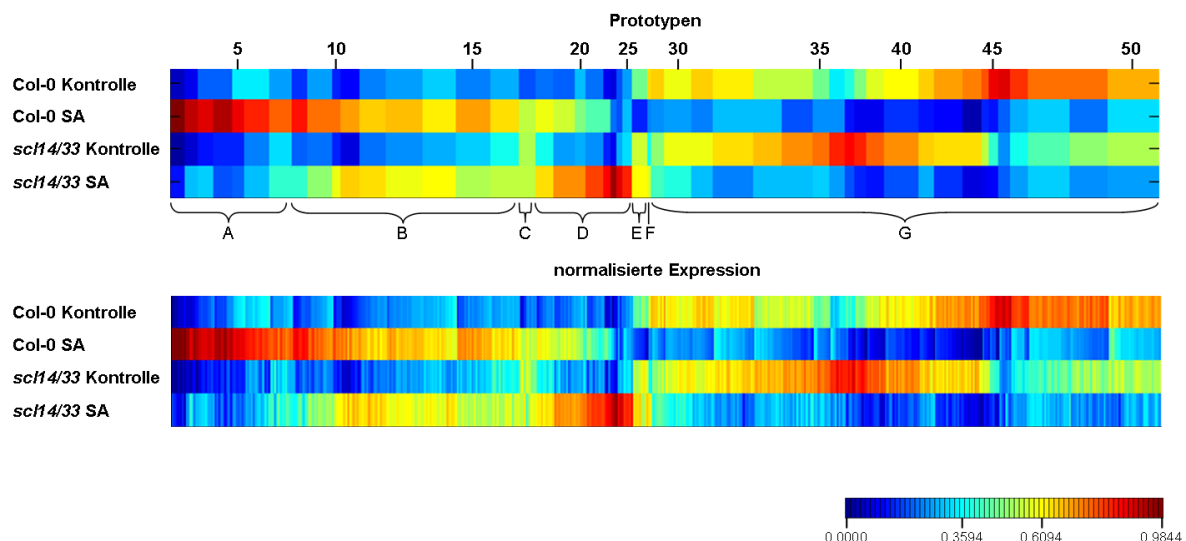
In die dritten Gruppe (C) wurden neun Gene eingeordnet, die im Wildtyp durch SA induziert wurden und in der Mutante sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach der SA-Behandlung so stark exprimiert wurden wie im Wildtyp nach SA-

Behandlung. In dieser Gruppe finden sich mit einem *HSP20*-ähnlichen Gen (*AT5G51440*), *COX19* und *HSP70* Gene, die an der Antwort auf toxischen bzw. oxidativen Stress und Hitzestress beteiligt sind (Chen et al. 2003; Attallah et al. 2007; Sung et al. 2001).

Die vierte Gruppe (D) enthält 50 Gene, die in der *sc14/33* Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach SA Behandlung hyperinduziert waren. Hierunter finden sich unter anderem acht Gene aus der Familie der WRKY-Transkriptionsfaktoren und Gene, die in die Pathogenabwehr involviert sind, wie *NIM INTERACTING 1* (*NIMIN1*) (Weigel et al. 2005) und *LEGUME LECTINE-LIKE PROTEIN1* (*LLP1*) (Breitenbach et al. 2014). Die fünfte Gruppe (E) enthält acht, ausschließlich chloroplastidäre, Gene, von denen es sich bei sechs um tRNAs handelt. Diese Gene werden im Wildtyp durch SA reprimiert, in der Mutante jedoch nicht.

Die sechste Gruppe (F) enthält zwei Gene, die im Wildtyp durch SA reprimiert und in der Mutante durch SA induziert wurden. Hierbei handelt es sich um ein Gen unbekannter Funktion (*AT2G16200*) und um *COP1 INTERACTING PROTEIN-RELATED*.

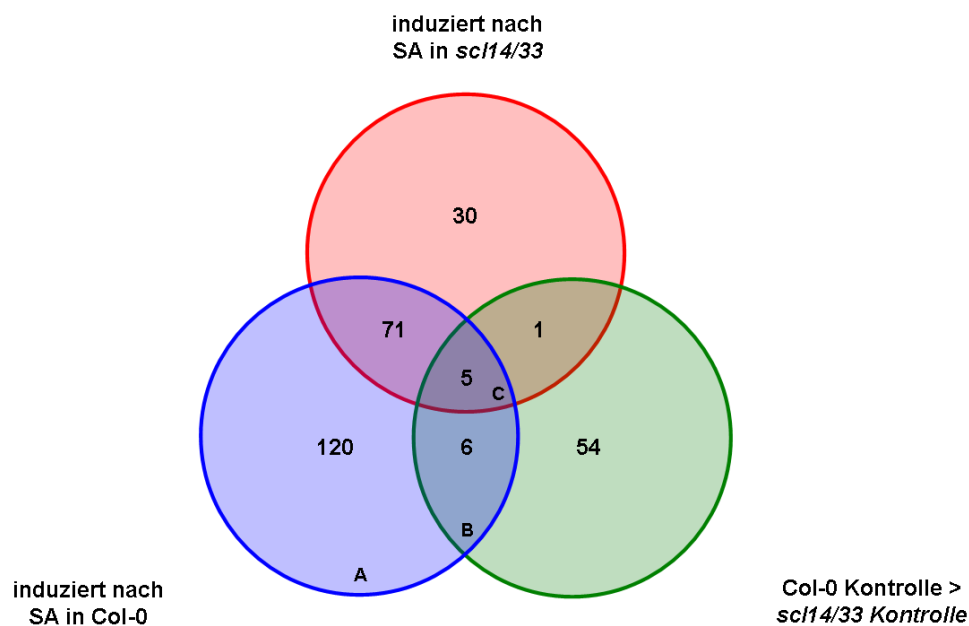
Die siebte Gruppe (G) enthält 265 Gene, deren Expression in beiden Genotypen durch SA unterdrückt wurde und von denen etwa 10% an der Entwicklung und der Morphogenese der Wurzel beteiligt sind.



**Abbildung 4.20: MarVis Analyse der von SA beeinflussten Gene in den *Arabidopsis thaliana* Genotypen Col-0 und *sc14/33*.**

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Einteilung der Gene in 50 Prototypen, entsprechend ihres normalisierten Expressionsmusters. Die Breite jedes Prototyps ist proportional zu der darin enthaltenen Anzahl an Genen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die normalisierte Expression der einzelnen Transkripte. Eine rote Färbung zeigt eine starke Expression an, eine blaue Färbung eine schwache Expression.

Die Gene, deren Expression in Col-0 oder in der *sc14/33* Mutante durch SA mindestens zweifach induziert wurde ( $p \leq 0,05$ ), wurden einer weiteren Analyse unterzogen. In Col-0 waren 202 Gene nach SA Behandlung mindestens zweifach induziert ( $p < 0,05$ ), in der *sc14/33* Mutante waren dies 107 Gene (Anhang Tab. 6.4 und 6.5). 71 Gene waren in beiden Genotypen induziert. Somit sind in dieser Microarray Analyse 131 Gene SCL14- und SCL33-abhängig durch SA induziert (Abb. 4.21).



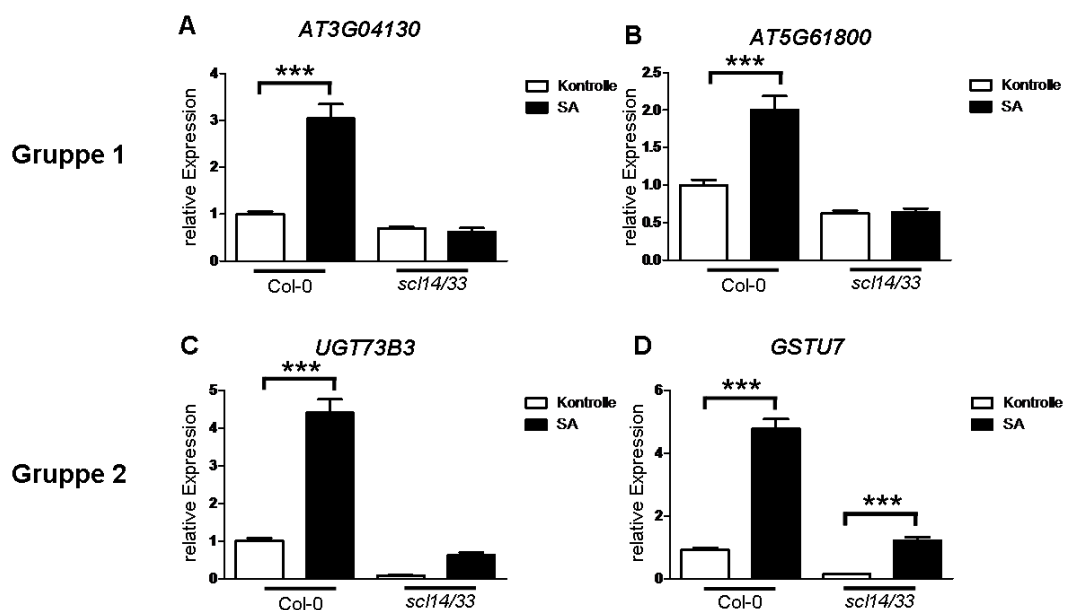
**Abbildung 4.21: Venn Diagramm der in Col-0 und in der *sc13/44* Mutante nach SA Behandlung induzierten Gene.**

Dargestellt sind die nach SA Behandlung im Wildtyp (induziert nach SA in Col-0) und in der *sc14/33* Mutante (induziert nach SA in *sc14/33*) induzierten Gene, sowie die Gene, deren basale Expression im Wildtyp höher ist als in der Mutante (Col-0 Kontrolle > *sc14/33* Kontrolle). In Feld A befinden sich die in Gruppe 1 eingeordneten Gene und in den Feldern B und C die in Gruppe 2 eingeordneten.

Die SA-induzierten Gene können, sowohl in Col-0 als auch in der *sc14/33* Mutante, in zwei Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe wird von 120 Genen (Anhang Tab. 6.1) gebildet, deren Expression sich in Col-0 und in der Mutante im uninduzierten Zustand nicht unterscheidet (Gruppe 1). Die zweite Gruppe umfasst 11 Gene (Anhang Tab. 6.2), deren basale Expression in der *sc14/33* Mutante gegenüber dem Wildtyp reduziert ist (Gruppe 2). In dieser Gruppe finden sich Glutathion S-Transferasen, UDP-Glycosyltransferasen und Transkriptionsfaktoren aus der NAC-Genfamilie. Die Gruppe enthält sowohl Gene, die nur in Col-0 induziert sind, als auch Gene, die in Col-0 und der *sc14/33* Mutante induziert sind. Generell können die Gene der Gruppe 1 als strikt SCL-abhängig bezeichnet werden, da in der *sc14/33*

Mutante keine Induktion der Gene nach SA-Behandlung zu beobachten ist. Für die Gene der Gruppe 2 hingegen fungiert SCL14 lediglich als Verstärker der Expression, da eine SA-Induktion auch in der *sc14/33* Mutante stattfindet und lediglich die absolute Höhe der Expression verringert ist. Bei 54 weiteren Genen war die Expression in der Mutante im uninduzierten Zustand im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls reduziert, jedoch fand bei diesen Genen in keinem der beiden Genotypen eine Induktion durch SA statt (Anhang Tab. 6.3).

Die Expression von je zwei repräsentativen Genen aus den Gruppen 1 und 2 nach SA-Behandlung ist in Abb. 4.22 dargestellt. Diese Gene wurden auch für weitere Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Realtime PCR verwendet.



**Abbildung 4.22: Expression der SCL14 Zielgene *AT3G04130*, *AT5G61800*, *UGT73B3* und *GSTU7* in Wurzeln nach SA-Behandlung.**

Die Gene der Gruppe 1 können als strikt SCL14-abhängig bezeichnet werden, da ihre basale Expression in der *sc14/33* Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert ist und keine Induktion der Genexpression in der Mutante erfolgt (A+B). Für die Gene der Gruppe 2 stellt SCL14 lediglich einen Verstärker der Expression dar, da die Expression dieser Gene auch in der Mutante induziert wird und lediglich die absolute Höhe der Expression verringert ist (C+D).

Die Behandlung mit 1 mM SA erfolgte für vier Stunden an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die relativen Transkriptmengen von *AT4G04130*, *AT5G61800*, *UGT73B3* und *GSTU7* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 13 – 15 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängigen Experimenten. (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

Aus Gruppe 1 sind dies das am stärksten durch SA induzierte Gen in dieser Gruppe, das PENTATRICOPEPTIDE REPEAT Protein *AT3G04130*, und *AT5G61800*, welches auch zu den PENTATRICOPEPTIDE REPEAT Proteinen gehört. Aus Gruppe 2 die beiden, in dieser Gruppe, am stärksten durch SA induzierten Gene, die



Glutathion S-Transferase *GSTU7* sowie die UDP-Glykosyltransferase *UGT73B3*. Über die genaue Funktion der beiden PENTATRICOPEPTIDE REPEAT Proteine ist noch nichts bekannt, *GSTU7* und *UGT73B3* sind an Detoxifikationsmechanismen beteiligt (Mueller et al. 2008; Simon et al. 2014).

Um Hinweise auf funktionelle Unterschiede der Gene in beiden Gruppen zu erhalten, wurde eine Genontologie-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde die agriGO Datenbank verwendet (Du et al. 2010). Das Programm vergleicht den Anteil von Genen der untersuchten Gruppe, die einer bestimmten Genontologie zugeordnet werden mit dem Anteil der Gene der Referenzgruppe, die der gleichen Genontologie zugeordnet werden und überprüft, ob hier signifikante Unterschiede vorliegen. Die Genontologien, in denen in Gruppe 1 und in Gruppe 2 eine signifikante Anreicherung im Vergleich zur Referenz (*Arabidopsis* genemodel (TAIR9)) zu beobachten war, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Signifikant angereicherte Genontologien in SA-induzierten Genen der Gruppen 1 und 2**

Gruppe	Genontologie	Anteil assoziierter Gene	FDR
Gruppe 1	Antwort auf Temperaturstimulus	7,7% / 1,3%	0,0015
	Hitzeantwort	6% / 0,43%	0,00017
	Antwort auf anorganische Substanzen	6,8% / 0,74%	0,00035
	Antwort auf Wasserstoffperoxid	4,3% / 0,14%	0,00017
Gruppe 2	Antwort auf Stimulus	45,5% / 10,7%	0,022
	Sekundärstoffwechselprozess	45,5% / 1,3%	0,0000019
	Transferaseaktivität	63,6% / 8,8%	0,000029

Gezeigt sind Genontologien, bei denen in Gruppe 1 oder Gruppe 2 eine Anreicherung von Genen vorliegt. In Spalte 3 ist der Anteil der den Genontologien assoziierter Gene in der untersuchten Gruppe und in der Referenz in der Form untersuchte Gruppe/Referenz angegeben. Bei den Genen der Gruppe 1 handelt es sich um solche, deren Expression strikt SCL-abhängig ist, bei den Genen der Gruppe 2 handelt es sich um solche, für die SCL14 nur einen Verstärker der Expression darstellt. Die Prozentzahlen geben an, welcher Anteil der Gene der untersuchten Gruppe bzw. der Referenz in die entsprechende Genontologie eingeordnet wurde. FDR: False Discovery Rate

Da SCL14 für die Gene der Gruppe 2 nur einen Expressionsverstärker darstellt, wurde eine Analyse der Promotoren der Gruppe 1 und der Gruppe 2 durchgeführt, um über die mögliche Anreicherung von unterschiedlichen Promotorelementen in den beiden Gruppen Rückschlüsse auf mögliche Transkriptionsfaktoren ziehen zu können, welche Schlüsselregulatoren dieser Gene darstellen. Für diese Analyse

wurde das Programm Motif Mapper cis-element analysis tool verwendet (Berendzen et al. 2012). Das Programm vergleicht die Anzahl spezifischer Bindestellen in den Promotoren der untersuchten Gene mit der durchschnittlichen Anzahl dieser Bindestellen in den Promotoren von der gleichen Anzahl von Genen, die 1000 mal zufällig aus dem gesamten Genom ausgewählt werden. In den Promotoren der Gruppe 1 sind neben *as-1*-ähnlichen Elementen, die als Bindestelle für den SCL14/TGA2-Komplex dienen, Bindestellen für ETHYLEN RESPONSE FACTORS (ERFs) und Transkriptionsfaktoren aus der NAC-Genfamilie angereichert. Eine Anreicherung von *as-1*-ähnlichen Elementen und NAC-Bindestellen ist in den Promotoren der Gruppe 2 ebenfalls zu beobachten. Zusätzlich sind hier *G-Boxen*, die Bindestellen für den Transkriptionsfaktor MYC2 und Transkriptionsfaktoren aus der bZIP-Familie, sowie *W-Boxen*, Bindestellen für Transkriptionsfaktoren aus der WRKY-Genfamilie überrepräsentiert. Da die letzteren beiden nicht in den Promotoren der Gruppe 1 angereichert sind, könnten WRKY-Transkriptionsfaktoren oder MYC2 bzw. *G-Box*-bindende bZIP-Transkriptionsfaktoren die Schlüsselregulatoren dieser Gene darstellen. Tabelle 4.2 zeigt repräsentative Beispiele für die angereicherten Sequenzen. Ähnliche Sequenzen, die ebenfalls angereichert waren, aber als Bindemotiv für den gleichen Transkriptionsfaktor dienen können, wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt.

**Tabelle 4.2: Signifikant angereicherte Promotorelemente in SA-induzierten Genen der Gruppen 1 und 2**

Gruppe	Motiv	Anreicherung	Transkriptionsfaktor	p
Gruppe 1	GCCGCC/CGGCGG	1,72-fach (22/13)	ERF1	0,0113
	AGCAGC/GCTGCT	1,51-fach (47/31)	ERF2	0,0064
	TGACGT/ACGTCA	1,61-fach (56/35)	TGA	0,0006
	TCCGTG/CACGGA	1,48-fach (25/17)	NAC	0,0233
Gruppe 2	CACGTG	4,53-fach (9/2)	MYC/bZIP	0
	TGACGT/ACGTCA	5,48-fach (16/3)	TGA	0
	TTVCGT/ACGBAA	1,61-fach (16/10)	NAC	0,0367
	TTGACY/RGTCAA	1,5-fach (20/13)	WRKY	0,0375

Angereicherte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotoren der Gene aus den Gruppen 1 und 2. Angegeben ist der Anreicherungsfaktor und die gefundene und die erwartete Anzahl der entsprechenden Elemente (gefunden/erwartet). B: nicht Adenin; R: Adenin oder Guanin; Y: Cytosin oder Thymin

In den Promotoren (-3000 BP-Region) der beiden Gene *GSTU7* und *UGT73B3* findet sich keine *G-Box*, MYC2 bzw. andere *G-Box* bindende Faktoren stellen also nicht

den Schlüsselregulator dieser beiden Gene dar. Beide Promotoren enthalten allerdings Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren. Diese könnten für diese beiden Gene daher die Schlüsselregulatoren darstellen. In beiden Promotoren sind auch Bindestellen für NAC-Transkriptionsfaktoren und Bindestellen für TGA-Transkriptionsfaktoren enthalten. Letztere finden sich bei *UGT73B3* innerhalb eines *as-1*-ähnlichen Elementes, bei *GSTU7* kommen, zusätzlich zu den in einem *as-1*-ähnlichen Elementen vorhandenen, zwei einzelne TGA-Bindemotive vor. Die Promotoren der beiden Gene *AT3G04130* und *AT5G61800* enthalten jeweils ein Bindemotiv für ERF2 und für NAC-Transkriptionsfaktoren, jedoch keine Bindemotive für TGA-Transkriptionsfaktoren. Die Regulation dieser beiden Gene durch den SCL14/TGA-Komplex muss also indirekt geschehen, möglicherweise über NAC-Transkriptionsfaktoren. Die identifizierten Promotorelemente sind in Tabelle 4.3 gezeigt.

**Tabelle 4.3: Identifizierte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in den Promotoren von *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT4G04130* und *AT5G61800***

Promotor	Motiv	Anzahl	Transkriptionsfaktor
<i>GSTU7</i>	-164 TTGACC -155	3/2,22	WRKY
	-545 TTGACT -540		
	-574 TTGACT -569		
	-813 TGC GTG -808	1/1	NAC
	-64 GTT <b>CGTCA</b> ctgg <b>TGACGTCA</b> -45	3/1,7	TGA
	-909 <b>TGACGTCT</b> -902		
	-2698 <b>TGACGTAA</b> -2691		
<i>UGT73B3</i>	-1028 TTGACC -1023	3/2,22	WRKY
	-1351 TTGACT -1346		
	-2780 TTGACC -2775		
	-54 TTCCGT -49	2/1,2	NAC
	-302 TTCCGT -297		
	-114 <b>TGACGTAT</b> gtca <b>CGACGTCA</b> -95	1/1,77	TGA
<i>AT3G04130</i>	-1312 AGCAGC -1307	1/1,34	ERF2
	-1239 TCCGTG -1234	1/1,09	NAC
<i>AT5G61800</i>	-2546 ACGACG -2541	1/1,34	ERF2
	-205 TTCCGT -200	1/1,13	NAC

Gezeigt sind die identifizierten Bindemotive für Transkriptionsfaktoren, die, gemäß der Promotoranalyse mit Motif Mapper, in der entsprechenden Gruppe im Vergleich zur Referenz angereichert waren. Die Anzahl der Elemente in den Promotoren der einzelnen Gene ist im Vergleich zur durchschnittlichen Anzahl der Elemente in den Promotoren der entsprechenden Gruppe angegeben (Anzahl der Elemente im Promotor/durchschnittliche Anzahl der Elemente). Die Bindemotive für TGA-Faktoren sind, sofern zutreffend, mit den *as-1*-ähnlichen Elementen angegeben. Die angereicherten TGA-Bindemotive innerhalb der *as-1*-ähnlichen Elemente sind in Fettschrift dargestellt.

### **4.3.3 Einfluss der Deletion von *SCL14* und *SCL33* auf die Genexpression**

In einer zweiten MarVis Analyse sollte der Effekt der Deletion von *SCL14* und *SCL33* auf die Genexpression untersucht werden. Hierfür wurden die Expressionsmuster der 620 Gene (Anhang Tab. 6.7), deren Expression sich in Col-0 und der *sc14/33* Mutante im uninduzierten Zustand oder nach SA-Behandlung um mindestens den Faktor zwei ( $p \leq 0,05$ ) unterschied mit MarVis visualisiert. Anhand ihrer Expressionsmuster konnten diese Gene in acht Gruppen eingeteilt werden (A'-H'; Abb. 4.23).

Die erste Gruppe (A') enthält 60 Gene und entspricht größtenteils der Gruppe A der SA-beeinflussten Gene.

In die zweite Gruppe (B') wurden 70 Gene eingeordnet, die im Wildtyp bereits im unbehandelten Zustand exprimiert wurden und deren Expression nicht durch SA beeinflusst wurde und die in der Mutante unter beiden Bedingungen nicht exprimiert wurden. Hier sind Gene überrepräsentiert die an der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress, wie Toxine und Pathogenbefall beteiligt sind.

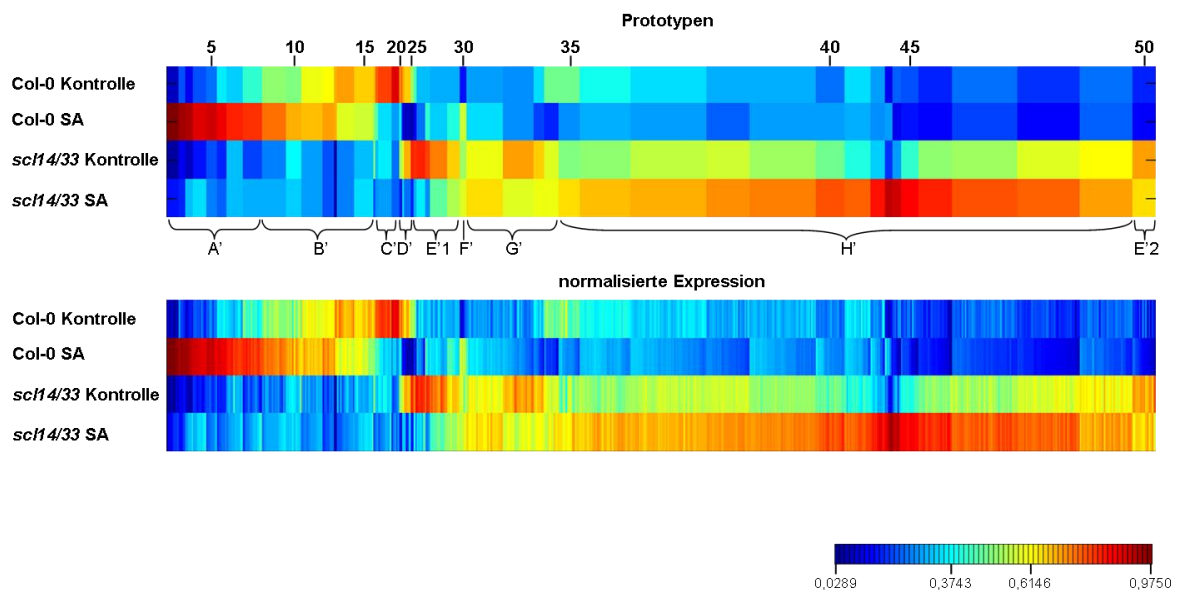
Die dritte Gruppe (C') enthielt 16 Gene, deren Expression im Wildtyp durch SA reprimiert wurden und die in der Mutante weder im uninduzierten Zustand noch nach SA exprimiert wurden. In dieser Gruppe war keine Anreicherung von Genen zu beobachten, die einer bestimmten Genontologie zuzuordnen waren.

In die vierte Gruppe (D') wurden zehn Gene eingeordnet, die in beiden Genotypen durch SA reprimiert wurden, deren Expression jedoch in der Mutante nach SA-Behandlung stärker war als im Wildtyp nach SA-Behandlung. In dieser Gruppe war keine Anreicherung von Genen zu beobachten, die einer bestimmten Genontologie zugeordnet werden konnten.

In die Gruppe E', die sich in die Gruppen E'1 und E'2 aufteilt, wurden 42 Gene eingeordnet, die im Wildtyp nicht exprimiert wurden und in der Mutante durch SA reprimiert wurden. In dieser Gruppe war keine signifikante Anreicherung von Genen zu beobachten, die einer bestimmten Genontologie zugeordnet werden konnten.

In der Gruppe G', in die 58 Gene eingruppiert wurden die im Wildtyp nicht und in der Mutante unabhängig von SA exprimiert waren, ist eine Anreicherung von Genen der Glucosinolat- und der Cysteinbiosynthese zu beobachten.

Die größte Gruppe in dieser Analyse ist die achte Gruppe (H'). Die 359 Gene, die in diese Gruppe eingeordnet wurden, waren im Wildtyp weder im unbehandelten Zustand noch nach SA-Behandlung exprimiert, in der Mutante war jedoch bei den meisten Genen bereits im unbehandelten Zustand eine Expression zu beobachten, die durch die SA-Behandlung verstärkt wurde. SCL14 scheint also als Repressor dieser Gene zu fungieren. Ein großer Teil der in diese Gruppe eingeordneten Gene sind im Stroma und in den Thylakoidmembranen von Chloroplasten zu finden und an der Photosynthese beteiligt, es konnte jedoch auch eine Anreicherung von Genen beobachtet werden, die an der Etablierung der SAR beteiligt sind. Diese Gene wurden in der ersten MarVis Analyse größtenteils nicht als SA-induzierte Gene erfasst, da der Induktionsfaktor in der Mutante für die meisten dieser Gene kleiner als zwei ist und die Einordnung in diese Analyse erfolgte aufgrund der Tatsache, dass sich die Expression in der Mutante von der Expression im Wildtyp entweder im uninduzierten Zustand oder nach SA-Behandlung um mindestens den Faktor zwei unterscheidet.

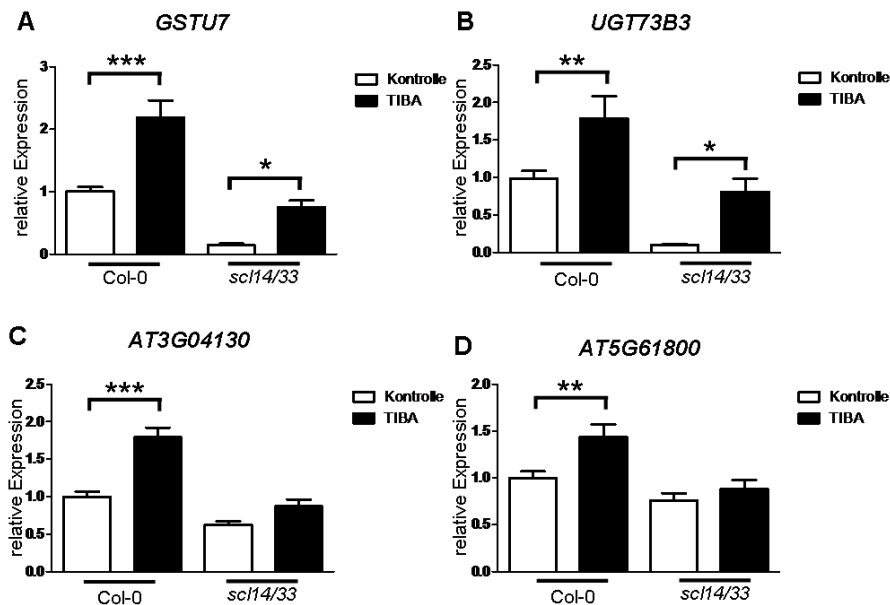


**Abbildung 4.23: MarVis Analyse der in Col-0 und *sc14/33* unterschiedlich exprimierten Gene.**

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Einteilung der Gene in 50 Prototypen, entsprechend ihres normalisierten Expressionsmusters. Die Breite jedes Prototyps ist proportional zu der darin enthaltenen Anzahl an Genen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die normalisierte Expression der einzelnen Transkripte. Eine rote Färbung zeigt eine starke Expression an, eine blaue Färbung eine schwache Expression.

#### **4.3.4 SA und TIBA induzieren die Expression von SCL14 Zielgenen in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana***

Für die Validierung der Ergebnisse des Microarray Experiments wurde die Expression der Gene *GSTU7*, *UGT73B3* (Gene der Gruppe 2) und *AT3G04130* sowie *AT5G61800* (Gene der Gruppe 1) nach der Behandlung mit SA und TIBA in unabhängigen Experimenten analysiert. Die Expression von *GSTU7* ist im uninduzierten Zustand in der *sc14/33* Mutante im Vergleich zum Wildtyp etwa um den Faktor sieben reduziert. Für *UGT73B3* beträgt der Unterschied etwa den Faktor 10. Die relative Induktion ist bei beiden Genen in der *sc14/33* Mutante jedoch stärker als im Wildtyp. Nach SA Behandlung beträgt der Induktionsfaktor für *GSTU7* in der Mutante 8,4 gegenüber 4,7 im Wildtyp (Abb. 4.19 A) und nach TIBA Behandlung 5,3 gegenüber 2,1 (Abb. 4.19 B). Für *UGT73B3* betragen die Induktionsfaktoren 7,5 gegenüber 4,4 nach SA Behandlung (Abb. 4.22 C) und 8 gegenüber 1,7 nach TIBA Behandlung (4.24 B). Sowohl *AT3G04130* als auch *AT5G61800* zeigen nach der Behandlung mit SA (Abb. 4.22 A und B) und TIBA (Abb. 4.24 C und D) im Wildtyp eine Erhöhung der Expression, welche in der *sc14/33* Mutante nicht zu beobachten ist. Außerdem zeigen die beiden Gene, im Gegensatz zu *GSTU7* und *UGT73B3*, nur eine sehr geringe Verringerung der basalen Expression im Vergleich zum Wildtyp. Somit konnten die Ergebnisse der Microarray Analyse bezüglich der Expression von *GSTU7*, *UGT43B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* nach SA-Behandlung und die Einordnung der Gene in die Gruppen 1 und 2 bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TIBA einen ähnlichen Effekt auf die Expression dieser vier Gene hat wie SA.

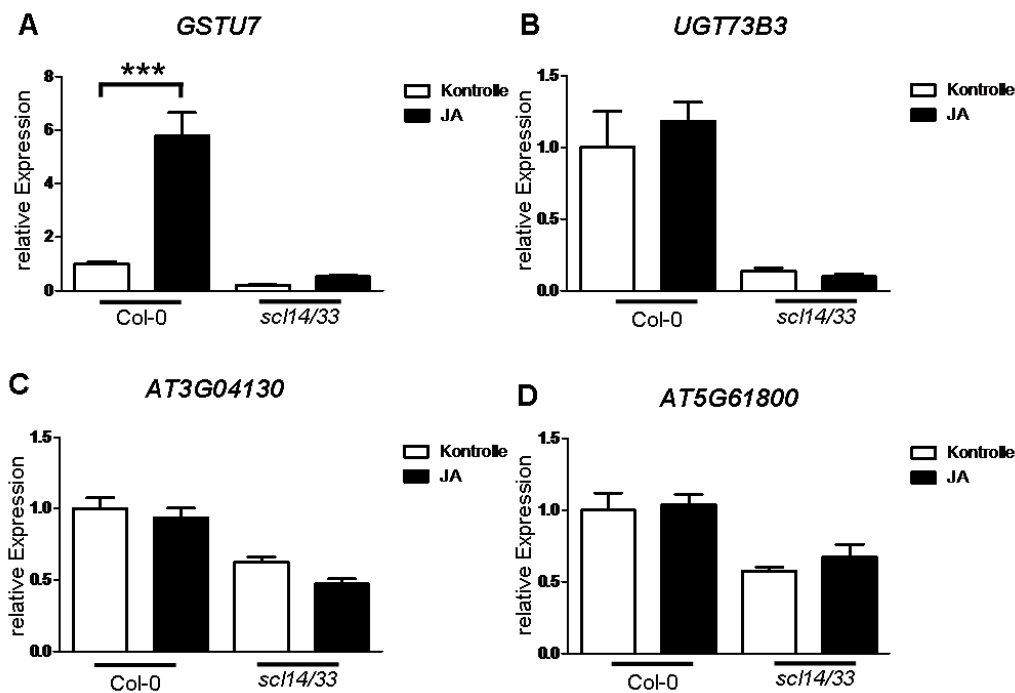


**Abbildung 4.24: Expression der SCL14 Zielgene *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* nach TIBA Behandlung.**

Die Behandlung mit 100  $\mu$ M TIBA erfolgte für vier Stunden an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die Extraktion der RNA erfolgte aus Wurzelmaterial. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 13 – 15 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängigen Experimenten. (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

#### **4.3.5 Jasmonsäure induziert die Expression von *GSTU7***

Die Behandlung mit Methyljasmonat führt nicht zur Akkumulation von SCL14 im Zellkern (Abschnitt 4.1.2). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass unter diesen Bedingungen auch keine Induktion der SCL14 Zielgene stattfindet. Für *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* trifft diese Annahme zu. Eine Ausnahme bildet jedoch *GSTU7*, da dieses Gen nach der Behandlung mit Methyljasmonat induziert wird (Abb. 4.25). Im Wildtyp beträgt der Induktionsfaktor 5,7 und in der *scl14/33* Mutante 2,5. *GSTU7* wird also durch Methyljasmonat ebenso induziert wie durch SA und TIBA. Allerdings ist die Induktion durch MeJA im Wildtyp stärker als in der Mutante, während es nach SA und TIBA umgekehrt ist. Für die Aktivierung von *GSTU7* scheint die induzierbare Akkumulation von SCL14 im Zellkern also nicht erforderlich zu sein, da das Gen auch unter Bedingungen SCL14–abhängig induziert werden kann, unter denen diese nicht zu beobachten ist.



**Abbildung 4.25: Expression der SCL14 Zielgene *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* nach MeJA Behandlung.**

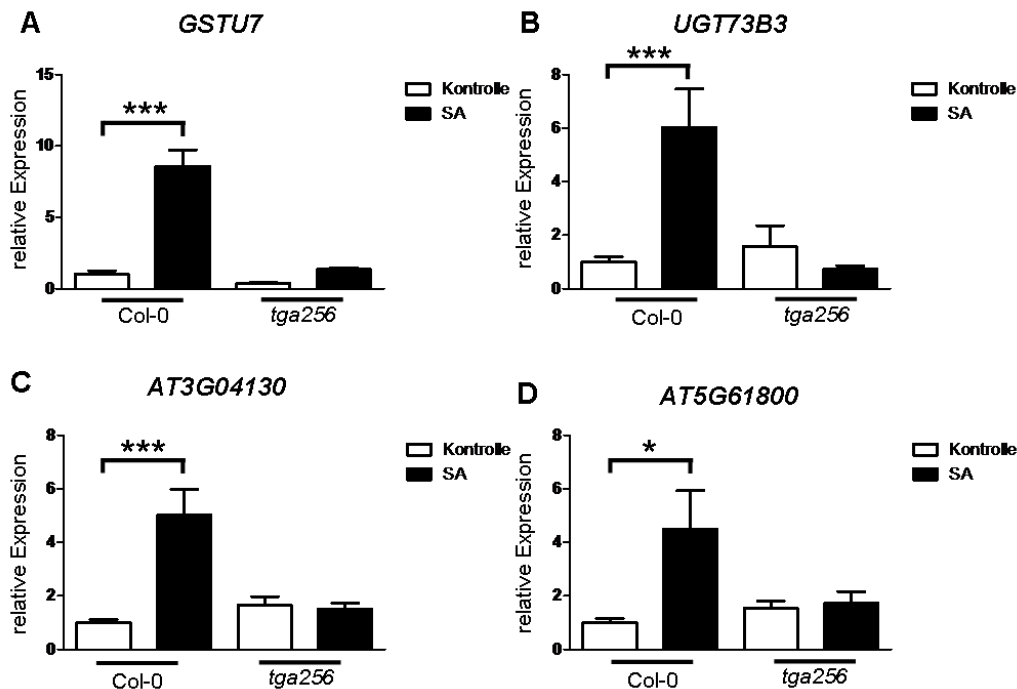
Die Behandlung mit 50  $\mu$ M SA erfolgte für vier Stunden an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die Extraktion der RNA erfolgte aus Wurzelmaterial. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 8 – 10 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten. (\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

#### **4.3.6 Die Expression von *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* ist abhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II**

SCL14 interagiert mit den TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II, TGA2, TGA5 und TGA6, wobei die Interaktion mit TGA5 im Hefe-Zwei-Hybrid-System sehr schwach ausgeprägt ist (Siemsen 2005). Das Vorhandensein dieser TGA-Faktoren ist in Blättern essentiell für die SA-induzierte Expression der SCL14 Zielgene (Fode et al. 2008). Um zu überprüfen, ob die Expression der SCL14 Zielgene auch in Wurzeln abhängig von den TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II ist, oder ob hier möglicherweise ein anderes Protein die Bindung von SCL14 an die DNA vermittelt, wurde die *tga256* Mutante im hydroponischen System angezogen und die Wurzeln mit SA behandelt. Die SA-induzierte Induktion von *GSTU7* in Col-0 ist in der Mutante nicht zu beobachten (Abb. 4.26). Das gleiche ist für die anderen getesteten Gene, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* zu beobachten. Daher ist sind die TGA-



Transkriptionsfaktoren der Klasse II sowohl für die Expression der Gruppe von Genen erforderlich, für die SCL14 einen Verstärker der Expression darstellt, als auch für die Expression der Gene, bei denen SCL14 der hauptsächliche Regulator ist.



**Abbildung 4.26: Expression der SCL14 Zielgene *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* in der *tga256* Mutante nach SA Behandlung.**

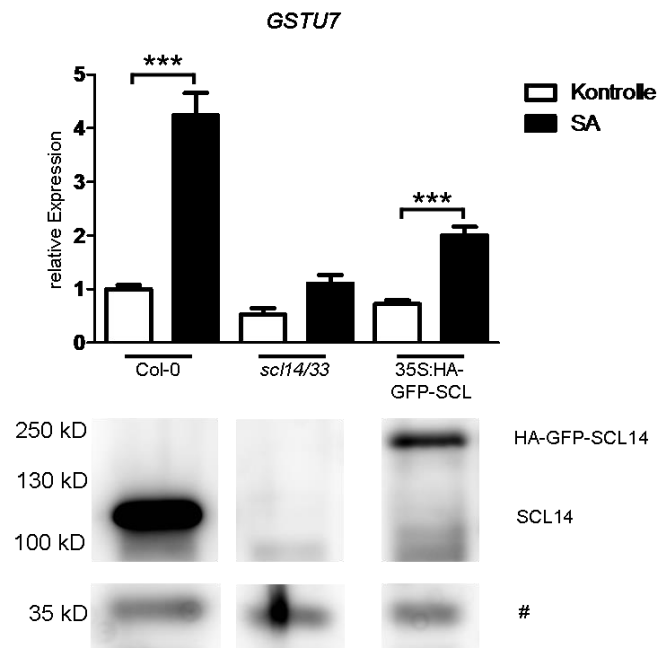
Die Behandlung mit 1 mM SA erfolgte für vier Stunden an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die Extraktion der RNA erfolgte aus Wurzelmaterial. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 8 – 9 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten. (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

#### **4.3.7 Das GFP-SCL14 Fusionsprotein komplementiert den Phänotyp der *sc14/33* Mutante**

Da ausgeschlossen werden sollte, dass das HA-GFP-SCL14 Fusionsprotein ein nichtfunktionales Protein ist, wurden transgene Pflanzen, die dieses Protein exprimieren, für 10 Tage unter Langtagbedingungen im hydroponischen System angezogen und für eine Stunde mit 1 mM SA behandelt und die Expression des SCL14 Zielgens *GSTU7* mittels qRT-PCR analysiert.

Die Expression von *GSTU7* ist in der transgenen Linie, nach der Behandlung mit SA, schwächer als im Wildtyp, jedoch signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle, während in der *sc14/33* Mutante keine signifikante Induktion des Gens zu

beobachten ist (Abb. 4.27). Die schwache Induktion in den transgenen Pflanzen kann ihre Ursache darin haben, dass das Fusionsprotein schwächer exprimiert ist als das endogene SCL14 Protein im Wildtyp. Wie auf dem Western Blot in Abb. 4.27 zu erkennen ist, ist die Bande des endogenen Proteins wesentlich stärker als die des Transgens.

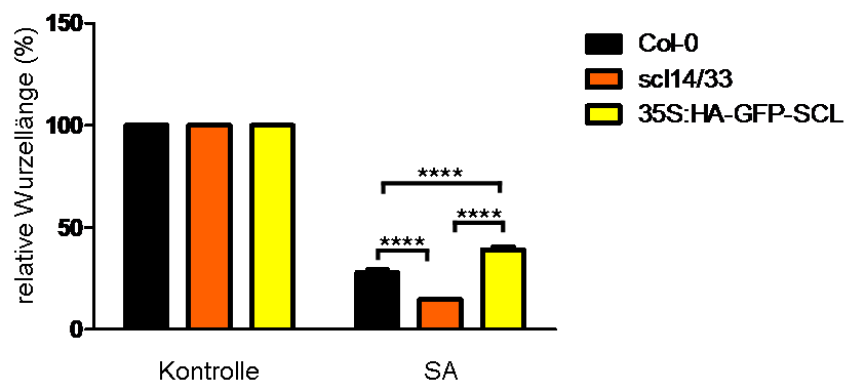


**Abbildung 4.27: Komplementation des *GSTU7* Expressionsphänotyps in der *sc14/33* Mutante durch HA-GFP-SCL14.**

Die Behandlung mit 1 mM SA erfolgte für vier Stunden an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die Extraktion der RNA erfolgte aus Wurzelmaterial. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 9 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängigen Experimenten. Der Western Blot zeigt die Proteinmengen des endogenen SCL14 in Col-0 und des Transgens in *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL. Die Detektion der Proteine erfolgte mittel eines gegen SCL14 gerichteten Antikörpers. # markiert eine unspezifische Bande, die als Auftragkontrolle genutzt werden kann. (\*\*\*) :  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

Um den Effekt des HA-GFP-SCL Fusionsproteins auf die SA-induzierte Reduktion des Wurzelwachstums zu testen, wurden Pflanzen der Genotypen Col-0, *sc14/33* und *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 auf Schrägagarplatten mit Murashige+Skoog Medium (MS) unter Langtagbedingungen angezogen. Nach sechs Tagen wurden die Pflanzen auf neue Schrägagarplatten mit oder ohne SA umgesetzt und die Wurzellänge gemessen. Nach weiteren sechs Tagen unter Langtagbedingungen wurde die Wurzellänge erneut gemessen und der relative Zuwachs berechnet (Abb. 4.28). Für den Wildtyp beträgt die Verringerung des Wurzelwachstums auf SA gegenüber der Kontrolle 72%. Die *sc14/33* Mutante ist stärker betroffen, hier beträgt die Verminderung des Wurzelwachstums gegenüber der Kontrolle 85%. In den

transgenen Pflanzen beträgt die Reduktion des Wurzelwachstums gegenüber der Kontrolle 60% und ist damit sogar weniger stark als im Wildtyp. Somit ist das HA-GFP-SCL14 Fusionsprotein in der Lage, sowohl den Genexpressionsphänotyp der *scl14/33* Mutante als auch die verstärkte SA-induzierte Reduktion des Wurzelwachstums zu komplementieren. Es handelt sich bei diesem Fusionskonstrukt von SCL14 also um ein funktionelles Protein.



**Abbildung 4.28: Relative Inhibition des Wurzelwachstums durch SA.**

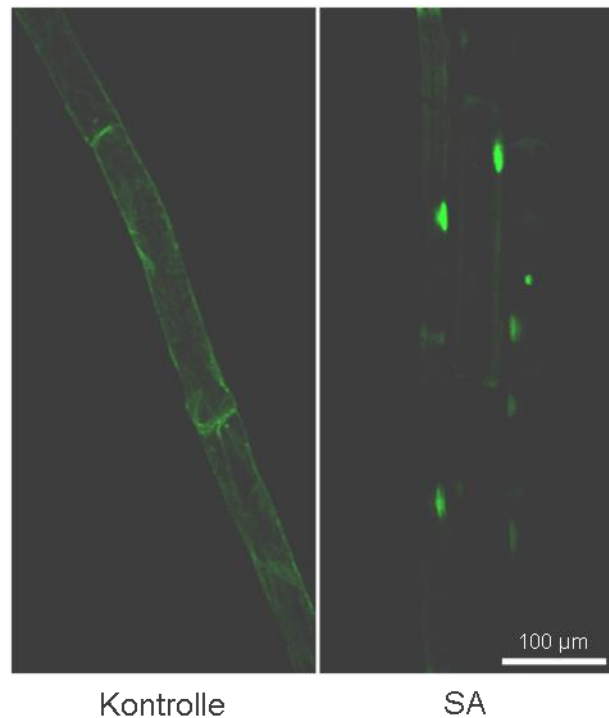
Die Pflanzen der Genotypen Col-0, *scl14/33* und *scl14/33* 35S:HA-GFP-SCL14 wurden sechs Tage auf MS-Agar unter Langtagbedingungen angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen auf MS-Agar ohne SA oder mit 100  $\mu$ M SA umgesetzt. Nach weiteren sechs Tagen wurde der relative Wurzelzuwachs bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 30 – 40 Pflanzen ( $\pm$  SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten (\*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )

#### **4.3.8 SCL14 akkumuliert auch im hydroponischen System nach SA**

##### **Behandlung im Zellkern**

Da die Pflanzen für die Untersuchung der Genexpression unter anderen Bedingungen angezogen wurden als für die mikroskopische Analyse der Lokalisation von SCL14, wurde getestet, ob die Akkumulation von SCL14 im Zellkern auch unter den Anzucht- und Induktionsbedingungen stattfindet, die für die Analyse der Genexpression verwendet wurden. Hierfür wurden transgene Pflanzen, die das HA-GFP-SCL14 Fusionsprotein exprimieren, für 10 Tage unter Langtagbedingungen im hydroponischen System angezogen und für eine Stunde mit 1 mM SA behandelt. Anschließend wurden die Wurzeln mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert.

In der Kontrolle ist keine Akkumulation der Fluoreszenz in den Zellkernen der untersuchten Wurzeln zu beobachten, in den mit SA behandelten Wurzeln kommt es jedoch zu einem Anstieg der Intensität der Fluoreszenz in den Zellkernen (Abb. 4.29). SCL14 akkumuliert also auch unter den Bedingungen, die für die Analyse der Genexpression gewählt wurden im Zellkern.



**Abbildung 4.29: HA-GFP-SCL14 akkumuliert im hydroponischen System nach SA Behandlung in Zellkernen von *Arabidopsis thaliana* Wurzelzellen.**

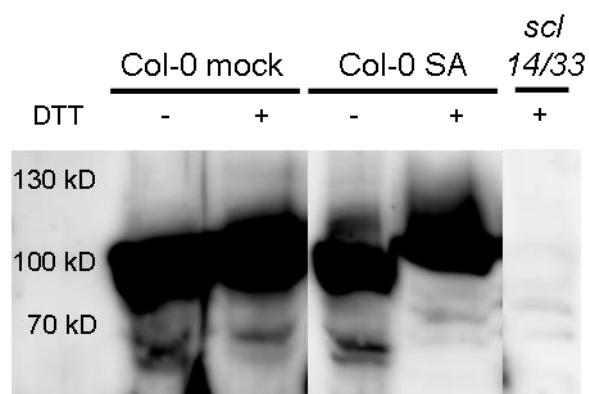
10 Tage alte Pflanzen des Genotyps *sc14/33* 35S:HA-GFP-SCL wurden mit 1 mM SA behandelt. Als Kontrolle diente Wasser. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte steril in hydroponischer Kultur unter Langtagbedingungen. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte 60 min nach Beginn der Behandlung.

#### **4.4 SCL14 scheint nach der Behandlung von *Arabidopsis* Wurzeln mit SA oxidiert zu werden**

Um herauszufinden, ob SCL14 unter Bedingungen, unter denen die Akkumulation des Proteins im Zellkern zu beobachten ist, oxidativ modifiziert wird, wurden Col-0 Pflanzen im hydroponischen System angezogen und für eine Stunde mit 1 mM SA behandelt. Mit Proteinextrakten aus dem geernteten Wurzelmaterial wurde eine Markierung der Proteine mit Methoxypolyethylen Glycol Maleimid-5000 (mPEG-Mal-5000) durchgeführt (Abschnitt 3.2.9). Hierbei werden zuerst reduzierte Cysteine durch eine Schutzgruppe maskiert. Anschließend werden oxidierte Cysteine reduziert und kovalent mit mPEG-Mal-5000 modifiziert. Diese Modifikation fügt dem Molekulargewicht eines Proteins 5 kDa pro gebundenem Molekül mPEG-Mal-5000 hinzu, sodass sich das Laufverhalten eines Proteins in einem SDS-Polyacrylamidgel ändert. Sofern nach SA Behandlung eines oder mehrere der Cysteine in SCL14 oxidiert vorliegen, sollte sich daher das Laufverhalten des Proteins im Vergleich zur Kontrolle ändern.

In der Kontrolle, die nicht mit DTT reduziert wurde, sollte kein mPEG-Mal-5000 an die Proteine gebunden haben, da alle reduzierten Cysteine mit einer Schutzgruppe maskiert wurden. In der reduzierten Kontrolle kann mPEG-Mal-5000 an das Protein gebunden haben, da nach der Reduktion mit DTT angreifbare Cysteine im Protein vorliegen, sofern sie vor dem Reduktionsschritt oxidiert waren. Die Proteinbande in dieser Spur (Col-0 Kontrolle, +DTT) läuft höher als in der Spur, in der die unreduzierte Kontrolle aufgetragen wurde (Col-0 Kontrolle, -DTT) (Abb. 4.30). Der Laufunterschied entspricht mit einem zusätzlichen Molekulargewicht von etwa 5 kDa der Masse eines mPEG-Moleküls.

In dem SA-behandelten Ansatz ist der Laufunterschied zwischen der Probe nach Reduktion (Col-0 SA, +DTT) und der Probe, die vor dem Markierungsschritt mit mPEG-Mal-5000 nicht reduziert wurde (Col-0 SA, -DTT), größer. Er entspricht mit einem zusätzlichen Molekulargewicht von etwa 10 kDa der Masse von zwei mPEG-Molekülen. SCL14 liegt also bereits im uninduzierten Zustand oxidiert vor, jedoch wird nach SA-Behandlung ein weiteres Cystein des Proteins oxidiert. Die hier gezeigten Daten bedürfen noch der Reproduktion, jedoch sind sie ein guter Hinweis darauf, dass die Oxidation von SCL14 das Signal für die Akkumulation des Proteins im Zellkern ist.



**Abbildung 4.30: Induktion eines Laufunterschiedes von SCL14 in einem SDS-Polyacrylamidgel durch Markierung mit mPEG-Mal-5000.**

Für die Markierung mit mPEG-Mal-5000 wurden Pflanzen der Genotypen Col-0 und *sc14/33* 10 Tage lang in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogen und eine Stunde mit 1 mM SA behandelt. Die Detektion des endogenen SCL14 Proteins im Western Blot erfolgte mit einem gegen SCL14 gerichteten Antikörper.

## **4.5 Suche nach Interaktionspartnern von SCL14 mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System**

Um neue Interaktionspartner von SCL14 zu finden, wurde das Protein im Hefe-Zwei-Hybrid-System als Köderprotein angeboten. Da SCL14 bereits eine Aktivierungsdomäne besitzt, welche sich im N-Terminus befindet, wurde nur die GRAS-Domäne verwendet, um eine Autoaktivierung der Transkription durch SCL14 zu vermeiden. Als neuer Interaktionspartner konnte der Transkriptionsfaktor NAC017 gefunden werden, der zur Familie der NAC Transkriptionsfaktoren gehört, die eine der größten Familien pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren darstellt. Die NAC Transkriptionsfaktoren werden durch ihre N-Terminale DNA Bindedomäne (NAC Domäne) charakterisiert, während ihr C-Terminus sehr variabel ist (Olsen et al. 2005).

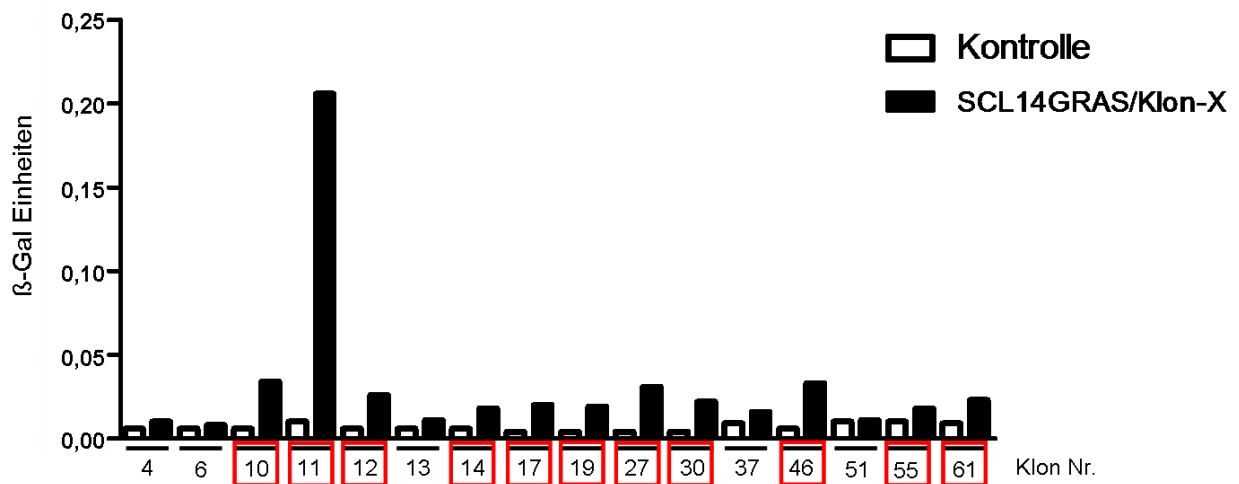
Der Hefe-Zwei-Hybrid-Test sowie die Charakterisierung der erhaltenen cDNA Klone wurden von Polina Demeshko im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

### **4.5.1 AtNAC017 interagiert mit der GRAS-Domäne von SCL14**

Für die Suche nach neuen Interaktionspartnern wurde die GRAS-Domäne von SCL14 in das Plasmid pGBKT7 kloniert. Die verwendete cDNA Bibliothek enthielt cDNAs aus *Arabidopsis* Suspensionszellkulturen im Plasmid pAct2 (Nemeth et al. 1998). Der Hefestamm PJ69-4A wurde mit dem Köderplasmid und der cDNA Bank transformiert und die Transformationsansätze auf Interaktionsmedium ausplattiert. Die Auswertung der Interaktionsplatten erfolgte nach vier Tagen bis zwei Wochen.

Nach dem Testen von  $1,2 \times 10^6$  Transformanden, wurden 64 Klone erhalten. Nach der Isolation der cDNA-Klone aus der Hefe und der Retransformation zusammen mit pGBKT7-SCL14GRAS war jedoch nur bei 16 davon ein erneutes Wachstum auf Interaktionsmedium zu beobachten. Mit diesen 16 Klonen wurde ein oNPG-Test durchgeführt, um die Proteine herauszufinden, die die stärkste Interaktion mit der SCL14 GRAS-Domäne aufwiesen. Von den 16 getesteten Klonen wiesen 11 im oNPG-Test eine, gegenüber der Kontrolle, mindestens zweifach erhöhte  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität auf, wobei Klon Nr.11 mit einer 20-fachen Erhöhung der  $\beta$ -Galactosidaseaktivität eine wesentlich stärkere Interaktion zeigt als die übrigen Klone (Abb. 4.31). Die 11 Klone, die im oNPG-Test eine mindestens zweifach Erhöhung der

$\beta$ -Galaktosidaseaktivität gegenüber der Kontrolle gezeigt haben, wurden sequenziert (siehe Tab. 4.4).



**Abbildung 4.31: Quantifizierung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionspartner der SCL14 GRAS-Domäne mittels oNPG-Test.**

Interaktionen, die eine mindestens zweifache Steigerung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität hervorrufen sind rot markiert. Für die genaue Bezeichnung der Interaktionspartner siehe Tabelle 1.3. Gezeigt ist der Mittelwert von 6 unabhängigen, biologischen Replikaten (Durchführung des Experiments von P. Demeshko im Rahmen ihrer Bachelorarbeit).

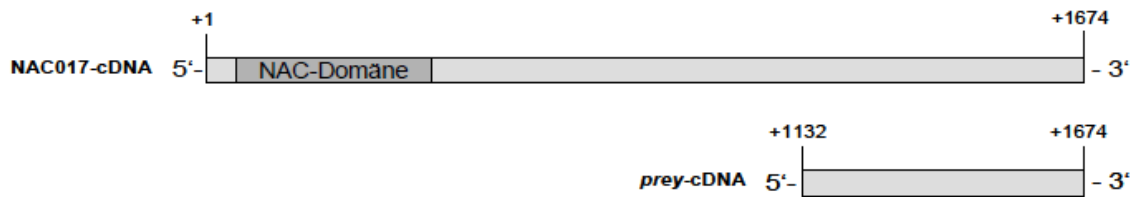
**Tabelle 4.4: Im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundene Interaktionspartner der SCL14 GRAS-Domäne**

Klon Nr.	Erhöhung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität	Gen	Proteinfunktion	Lokalisation
11	22,3	At1G34190.1	Transkriptionsfaktor	Zellkern
27	7,9	At1G47128.1	Peptidligase, Protease	Vak., Chlp., Apo.
10	5,5	At4G35090.1	Katalase	Chlp., Per.
30	5,3	At1G20620	Katalase	Membran, Vac., Chlp.
17	5,1	At1G14700.1	Phosphatase	Vac.
19	5,0	At5G19090.3	Schwermetall Detoxifi- kation, Metallionen Bindung und Transport	Plasmo- desmata
12	4,2	At1G29900.1	Carbamoylphosphat- syntethase	Membrane Chlp.
46	3,6	At5G40190.1	Calmodulin Bindeprotein	Intrazellulär
14	2,9	At5G63470.1	Transkriptionsfaktor	Zellkern
61	2,5	At4G49580.1	Reaktion auf Schwefelmangel	unbekannt
55	2,0	At1G01910	ATP Bindung, Metallionen Homöostase	Membran

Bei Klon Nummer 11, der nach den Ergebnissen des oNPG-Tests von den gefundenen Interaktionspartnern die stärkste Interaktion mit der GRAS-Domäne von SCL14 darstellt, handelt es sich um den Transkriptionsfaktor NAC017. In den Promotoren der Gruppen 1 und 2 der SCL14 Zielgene sind Bindestellen für NAC-Transkriptionsfaktoren überrepräsentiert (Tab. 4.2) und die Promotoren der Gene *GSTU7* und *UGT73B3* enthalten potentielle NAC-Bindestellen. Da eine Kooperation der beiden Proteine an den Zielpromotoren möglich ist, wurden die Interaktion von NAC017 mit SCL14 und der Einfluss von NAC017 auf die Expression von SCL14 Zielgenen eingehender untersucht.

Der Klon enthielt nicht die vollständige cDNA, sondern ein Fragment, welches dem 3'-Ende von Nukleotid 1132 bis Nukleotid 1674 entspricht (Abb. 4.32). In diesem Fragment ist die NAC Domäne, welche die Bindung der NAC Transkriptionsfaktoren an die DNA vermittelt, nicht enthalten.





**Abbildung 4.32: Struktur der im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen cDNA von NAC017 (P. Demeshko).**

Das gefundene cDNA-Fragment umfasst das 3'-Ende von Nukleotid Nr. 1132 bis Nukleotid Nr. 1674 der vollständigen NAC017 cDNA und kodiert somit für den C-Terminus des NAC017-Proteins und beinhaltet daher nicht die NAC Domäne, welche die NAC Transkriptionsfaktoren charakterisiert und deren Bindung an die DNA vermittelt (Welner et al. 2012).

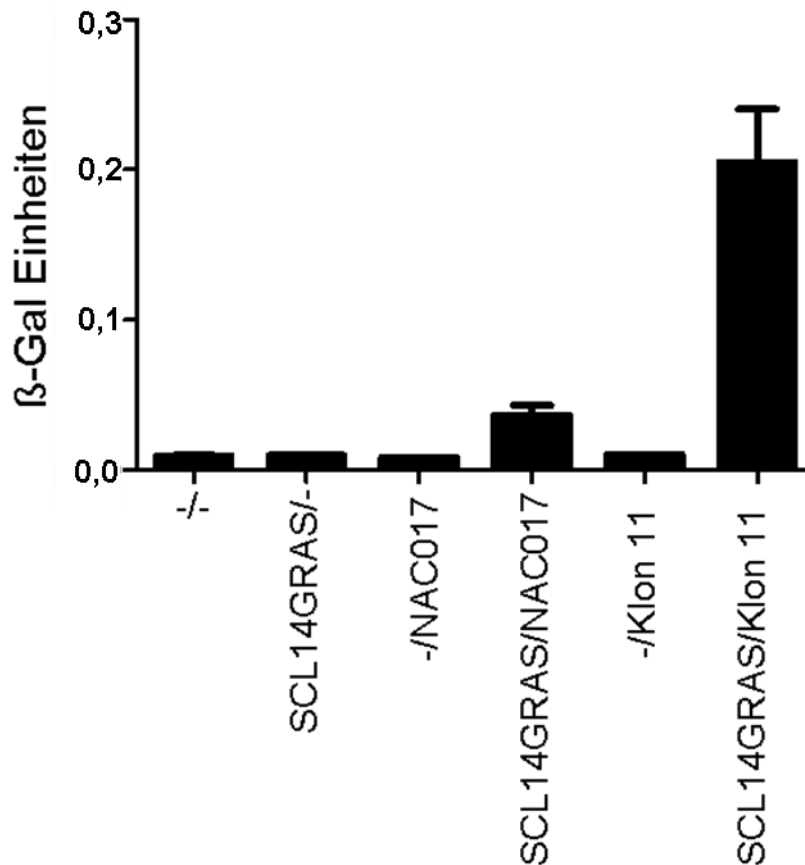
Um zu testen, ob auch der vollständige Transkriptionsfaktor NAC017 mit SCL14 interagiert, wurde die vollständige cDNA von NAC017 amplifiziert und in das Plasmid pAct2 kloniert. Es folgte die Kotransformation der Hefe PJ69-4A mit pAct2-NAC017 und pGBKT7-SCL14GRAS und das Ausplattieren der Transformationsansätze auf Selektions- und Interaktionsmedium sowie ein oNPG-Test. Nur die Hefen welche sowohl mit NAC017 als auch mit der SCL14 GRAS-Domäne transformiert worden sind, wachsen auf Interaktionsmedium, während kein Wachstum der Hefen zu beobachten ist, die nur SCL14 oder nur NAC017 beziehungsweise nur die Leerplasmide enthalten (Abb. 4.33).



**Abbildung 4.33: Wachstum von mit SCL14 und NAC017 transformierten Hefen des Stammes PJ69a auf Interaktionsmedium (P. Demeshko).**

Im oNPG-Test wird deutlich, dass die Interaktion des C-Terminus von NAC017 mit der GRAS-Domäne von SCL14 um etwa den Faktor fünf stärker ist, als die

Interaktion des vollständigen NAC017. Allerdings ist diese Interaktion wiederum um den Faktor fünf stärker als die Negativkontrolle (Abb. 4.34). Somit konnte gezeigt werden, dass auch der vollständige Transkriptionsfaktor NAC017 mit der GRAS-Domäne von SCL14 interagiert.

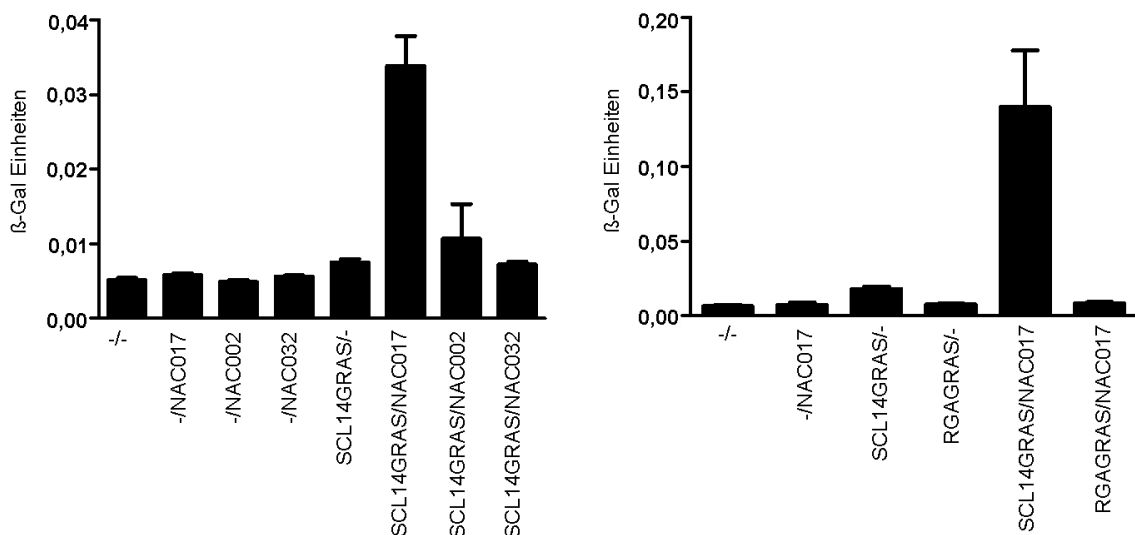


**Abbildung 4.34: Quantifizierung der Interaktion der GRAS-Domäne von SCL14 mit dem im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen C-terminalen Teil von NAC017 und dem NAC017 Volllängenprotein mittel oNPG-Test.**

Gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen, biologischen Replikaten ( $\pm$  SEM). (Durchführung des Experiments von P. Demeshko im Rahmen ihrer Bachelorarbeit).

Um zu prüfen, ob SCL14 spezifisch mit NAC017 oder auch mit anderen NAC Faktoren interagiert, wurde die SCL14 GRAS-Domäne im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf ihre Interaktion mit NAC002 und NAC032 getestet. Hierfür wurde der Hefestamm PJ69-4A mit der SCL14 GRAS-Domäne und jeweils einem der drei NAC Transkriptionsfaktoren NAC002, NAC017 und NAC032 kotransformiert. Im oNPG-Test lässt sich wiederum eine Interaktion zwischen der SCL14 GRAS-Domäne und NAC017 beobachten, da in den Hefeklonen, die mit diesen beiden Proteinen transformiert wurden, eine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden kann. Die Hefeklonen, die NAC002

beziehungsweise NAC032 enthalten, zeigen diese Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nicht (Abb. 4.35). Es findet also keine Interaktion dieser beiden Proteine mit der SCL14 GRAS-Domäne statt. Da auch die Spezifität von NAC017 für die GRAS-Domäne von SCL14 getestet werden sollte, wurde die Interaktion des Proteins mit der GRAS-Domäne von SCL14 und der GRAS-Domäne des DELLA Proteins Repressor of GA1 (RGA) in einem oNPG-Test verglichen. Wie Abb. 4.35 zeigt, kann in den Hefeklonen, die mit NAC017 und der GRAS-Domäne von RGA transformiert wurden, keine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden, während in den Hefeklonen, die NAC017 und die SCL14 GRAS-Domäne enthalten, wiederum eine Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität beobachtet werden kann. NAC017 interagiert also nicht mit der GRAS-Domäne von RGA. Die Interaktion von SCL14 und NAC017 kann somit als spezifisch angesehen werden.



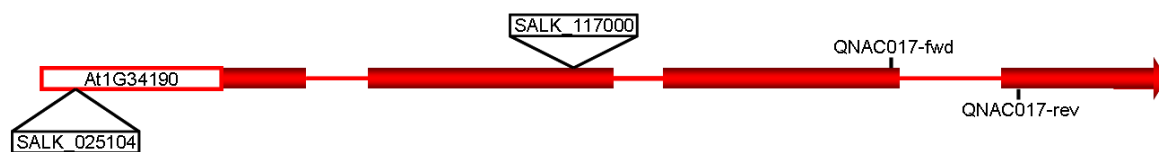
**Abbildung 4.35: Quantifizierung der Interaktion zwischen der GRAS-Domäne von SCL14 mit den NAC Transkriptionsfaktoren NAC002, NAC017 und NAC032, sowie der GRAS-Domänen von SCL14 und RGA mit NAC017 mittels oNPG-Test.**

Gezeigt ist der Mittelwert von 3 unabhängigen, biologischen Replikaten ( $\pm$  SEM).

#### **4.5.2 Charakterisierung einer NAC017 T-DNA Insertionslinie**

Um die Bedeutung von NAC017 für die Expression der Zielgene von SCL14 zu untersuchen, wurden zwei T-DNA Insertionslinien, SALK\_025104 und SALK\_117000 charakterisiert. Die Insertion in der Linie SALK\_025104 befindet sich im 5'-nichttranslatierten Bereich des *NAC017* Gens, während sich die Insertion in der Linie SALK\_117000 im zweiten Exon befindet (Abb. 4.36). Um festzustellen, ob es sich bei

den beiden Linien um *knockout* Linien handelt, oder ob noch *NAC017* mRNA in den Pflanzen gebildet wird, wurde eine *quantitative RealTime PCR* mit cDNA aus Pflanzen der beiden Insertionslinien als Amplifikationsvorlage durchgeführt. Bei den hierfür verwendeten Oligonukleotiden handelt es sich um *Quantitect Primer*<sup>®</sup> der Firma Qiagen. Das vorwärts gerichtete Oligonukleotid bindet am Ende des dritten Exons (QNAC017-fwd) und das rückwärts gerichtete Oligonukleotid bindet am Anfang des vierten Exons (QNAC017-rev) (Abb. 4.36).

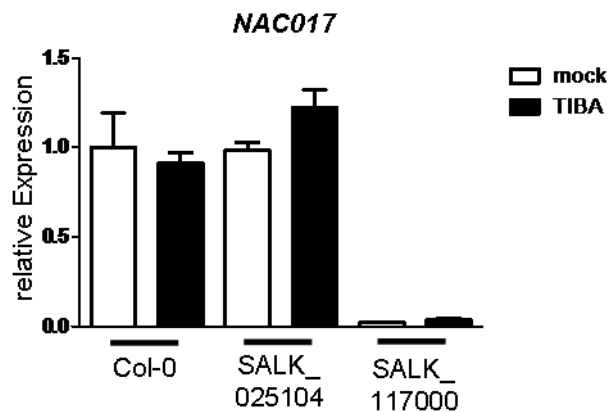


**Abbildung 4.36:** Intron/Exon Struktur des *NAC017* Gens mit den Positionen der T-DNA Insertionen und der qRT-PCR Oligonukleotide.

Für die *quantitative RealTime PCR* wurde cDNA aus Pflanzen verwendet, die für vier Wochen unter Kurztagbedingungen auf Erde angezogen und für acht Stunden mit 100  $\mu$ M TIBA behandelt wurden. Die TIBA Behandlung erfolgte durch Besprühen der Blätter. Für die RNA-Extraktion und die anschließende cDNA-Synthese wurden die Blätter geerntet, in Stickstoff eingefroren und gemörsert.

In der T-DNA Insertionslinie *SALK\_025104* entspricht die Expression der *NAC017* mRNA der im Wildtyp. Hier scheint die T-DNA Insertion keinen Einfluss auf die Expression des Gens zu haben. Diese Linie kann somit nicht verwendet werden, um die Bedeutung von *NAC017* für die Expression der *SCL14* Zielgene zu untersuchen. In der Linie *SALK\_117000* ist die Expression von *NAC017* stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.37). Da in dieser Insertionslinie das *NAC017* Gen nicht mehr exprimiert wird, wird diese Linie für alle weiteren Experimente unter der Bezeichnung *nac017* verwendet.

Wie ebenfalls aus Abb. 4.37 ersichtlich, ändert sich die Expression von *NAC017* nach der Behandlung der Pflanzen mit TIBA nicht. Bedingungen, die zu einer Induktion der *SCL14* Zielgene führen, rufen also keine Änderung der Expression des *SCL14* Interaktionspartners *NAC017* hervor.

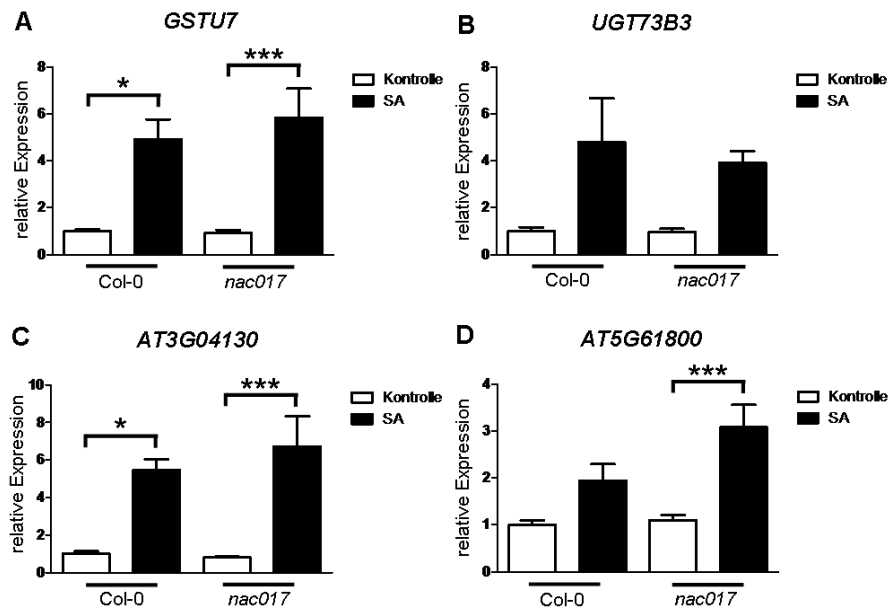


**Abbildung 4.37: Expression von NAC017 in den T-DNA Insertionslinien SALK\_025104 und SALK\_117000 nach TIBA Behandlung.**

Die Behandlung mit 100  $\mu$ M TIBA erfolgte für acht Stunden an vier Wochen alten, auf Erde unter Kurztagbedingungen angezogenen Pflanzen durch Sprühen. Geerntet wurde Blattmaterial. Die relativen Transkriptmengen von *NAC017* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 8 – 10 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten.

#### **4.5.3 Expression von SCL14 Zielgenen in der *nac017* Mutante**

Für die Analyse der Expression der SCL14 Zielgene in der *nac017* Mutante wurden die Pflanzen für 10 Tage im hydroponischen System angezogen und für eine Stunde mit 1 mM SA behandelt. Aus dem geernteten Wurzelmaterial wurde die RNA extrahiert und mittels qRT-PCR analysiert. Bei den drei Genen *GSTU7*, *UGT73B3* und *AT3G04130* ist kein deutlicher Unterschied der Expression in der *nac017* Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, zu beobachten. *GSTU7* und *AT3G04130* zeigen in beiden Genotypen nach SA-Behandlung eine signifikante Erhöhung der Expression (Abb. 4.38 A und C). Bei *UGT73B3* ist ebenfalls eine Erhöhung der Expression nach SA-Behandlung zu beobachten, jedoch ist diese in beiden Genotypen nicht signifikant (Abb. 4.38 B). Die Expression von *AT5G61800* ist im Wildtyp ebenfalls nicht signifikant erhöht, in der *nac017* Mutante hingegen schon (Abb.4.38 D). Somit scheint NAC017 einen Effekt auf die Expression dieses Gens zu haben.



**Abbildung 4.38: Expression der SCL14 Zielgene *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* in der *nac017* Mutante nach SA Behandlung.**

Die Behandlung mit 1 mM SA erfolgte für eine Stunde an 10 Tage alten, in hydroponischen Kulturen unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 8 – 9 Pflanzen ( $\pm$  SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten. (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; One-way ANOVA)

## **5 Diskussion**

Die Detoxifikation xenobiotischer Substanzen in Pflanzen kann in drei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Abschnitt erfolgt die Aktivierung der Substanzen durch das Einfügen reaktiver Gruppen durch Enzyme wie Cytochrom P450 Monooxygenasen. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche Entgiftung durch die Konjugation mit hydrophilen Molekülen wie Glutathion durch Glutathion S-Transferasen oder Glucose durch Glycosyltransferasen. Im dritten Schritt werden die konjugierten Substanzen durch ATP-abhängige Transporter in die Vakuole oder den apoplastischen Raum transportiert (Coleman et al. 1997). Die an diesem Entgiftungsprogramm beteiligten Gene werden durch chemischen Stress induziert und ein Teil davon wird durch das GRAS-Protein SCARECROW-like 14 (SCL14) reguliert. SCL14 wurde in einem Proteininteraktionsexperiment in der Hefe als Interaktionspartner des bZIP-Transkriptionsfaktors TGA2 gefunden (Fode et al. 2008). Für die Aktivierung der SCL14 Zielgene ist die Bildung des SCL14/TGA2-Komplexes notwendig, da SCL14 keine DNA-Bindfähigkeit besitzt. Der SCL14/TGA2-Komplex bindet an *as-1*-ähnliche Sequenzen in den Promotoren seiner Zielgene. Dies allein führt jedoch noch nicht zur Aktivierung der Transkription, da der Komplex sowohl im uninduzierten als auch im induzierten Zustand an die DNA gebunden vorliegt (Fode et al. 2008). Da in Tabakprotoplasten ein konstanter Austausch des SCL14 Proteins zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma beobachtet werden konnte, wurde in dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob dieser Austausch auch in *Arabidopsis* stattfindet und ob er eine Bedeutung für die Regulation von SCL14 hat. Des Weiteren konnte die Bedeutung von im Protein vorhandenen Cysteinen für die Aktivität von SCL14 nachgewiesen werden. In einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment, in dem die GRAS-Domäne von SCL14 als Köderprotein angeboten wurde, konnte der Transkriptionsfaktor NAC017 als neuer Interaktionspartner von SCL14 identifiziert werden.

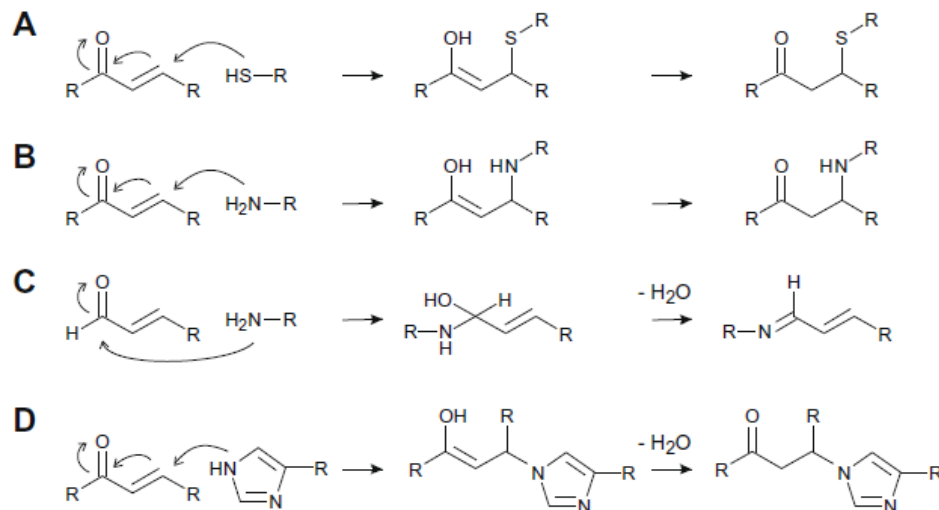
Im Folgenden wird diskutiert, wie die drei xenobiotischen Substanzen SA, TIBA und OPDA zu einer Kernakkumulation von SCL14 führen können, welche Rolle die in SCL14 vorhandenen Cysteine dabei spielen können, wie sich diese Prozesse auf die Expression SCL14-abhängiger Gene auswirken und welche Rolle NAC017 bei der Regulation dieser Gene spielen könnte.

## **5.1 Unterschiedliche Substanzen führen zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern**

Die von Fode et al. beobachtete Akkumulation von SCL14 im Zellkern von Tabakprotoplasten durch die Inhibition des Kernexports mit LMB (Fode et al. 2008) konnte in dieser Arbeit ebenfalls in Wurzeln von *Arabidopsis* gezeigt werden (Abb. 4.2). Weiterhin erfolgte diese Akkumulation nach Behandlung der Pflanzen mit SA, TIBA und OPDA (Abb. 4.3 und 4.4), welche, im Gegensatz zu LMB, keine generellen Inhibitoren des Kernexports darstellen. Daraus ergeben sich die Fragen, ob die Akkumulation von SCL14 im Zellkern nach SA-, TIBA, und OPDA-Behandlung, wie bei LMB, eine Folge der Inhibition des Kernexports des Proteins ist, oder ob beispielsweise der Kernimport verstärkt wird, und welche gemeinsame Eigenschaft, die die drei Substanzen aufweisen, zu der beobachteten Akkumulation führen kann. Auf die Frage, ob die Akkumulation von SCL14 im Zellkern eine Folge des Kernimports oder des Kernexports ist, wird in Abschnitt 5.2 eingegangen.

Für die Beantwortung der Frage, durch welches gemeinsame Charakteristikum SA, TIBA und OPDA die Kernakkumulation von SCL14 auslösen können, ist es notwendig, sich mit den chemischen Eigenschaften dieser Substanzen zu beschäftigen. Bei allen dreien handelt es sich um reaktive Moleküle, die in höheren Konzentrationen zellschädigend wirken (Anderson et al. 1998; Berger et al. 2007; Fode et al. 2008) und sowohl SA und TIBA als auch OPDA induzieren die Expression von Genen, deren Genprodukte an der Entgiftung xenobiotischer Substanzen, aber auch an der Reparatur endogener Strukturen beteiligt sind (Uquillas et al. 2004; Fode et al. 2008; Mueller et al. 2008). Aufgrund ihrer strukturellen Heterogenität könnte es sein, dass die Wahrnehmung dieser Chemikalien und die daraus resultierende Aktivierung der Genexpression nicht über die direkte Erkennung der Chemikalien durch einen Rezeptor erfolgt, sondern dass vielmehr Schädigungen in der Zelle wahrgenommen werden. Für OPDA und SA wurde bereits untersucht, auf welche Art und Weise diese beiden Substanzen solch eine Zellschädigung hervorrufen können. Bei OPDA wird dieser schädigende Effekt auf die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe (Abb. 2.6) zurückgeführt (Mueller et al. 2008), welche in einer Michael-Addition mit nukleophilen Gruppen, wie zum Beispiel Thiolen von Proteinen, reagieren und dadurch oxidativen Stress hervorrufen kann (Abb. 5.1).





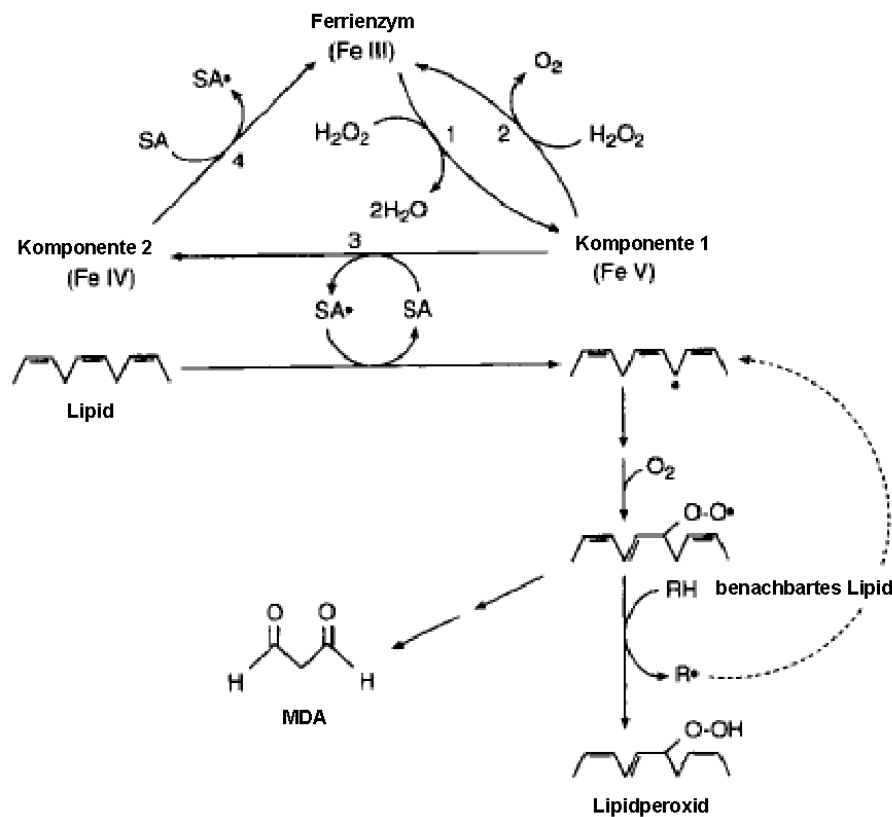
**Abbildung 5.1: Reaktion von α,β-ungesättigten Carbonylgruppen mit Thiolen und Aminen (Michael-Addition).**

Thiolgruppen von Proteinen und Amine von Proteinen und Nukleinsäuren reagieren mit Molekülen, die eine α,β-ungesättigten Carbonylgruppe enthalten. Dabei kann der Angriff entweder auf das β-Kohlenstoffatom erfolgen (A,B und D), oder auf das Carbonylkohlenstoffatom (D). (Mueller & Berger 2009)

Der Effekt von SA verläuft vermutlich über die Bildung eines SA-Radikals. Dieses entsteht durch die Übertragung eines Elektrons des SA-Moleküls auf die Katalase, welche dadurch inaktiviert wird, was zur Akkumulation von Wasserstoffperoxid führt (Anderson et al. 1998) (Abb. 5.2). Das SA-Radikal kann dann wiederum die Oxidation von Membranlipiden zu Lipidperoxiden auslösen, welche sowohl in den Membranen akkumulieren und deren selektive Permeabilität stören, als auch aus den Membranen freigesetzt werden und selbst weitere Schäden hervorrufen können (Mueller 2004).

Die Oxidation der Lipide geschieht nicht durch das entstandene Wasserstoffperoxid, da eine Inhibition der Katalase durch 3-Aminotriazol (3-AT), was ebenfalls zu einer Ansammlung von Wasserstoffperoxid führt aber die Bildung des SA-Radikals verhindert, nicht zu einer verstärkten Bildung von Lipidperoxiden führte (Anderson et al. 1998). Auch Garretón et al. konnten zeigen, dass die SA-vermittelte Aktivierung des *as-1* Elementes durch oxidativen Stress erfolgt, da die Aktivierung des *as-1* Elementes durch die Antioxidantien Dimethylthiourea (DMTU) und 3-t-butyl-4-hydroxy-Anisol (BHA) verhindert werden konnte. Wie bereits Anderson et al., konnten auch Garretón et al. durch die Inhibition der Katalase mit 3-AT zeigen, dass der Effekt von SA nicht durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermittelt wird (Garretón et al. 2002). Ob DMTU und BHA die SA-induzierte Akkumulation von SCL14 im Zellkern unterbinden können, konnte in dieser Arbeit nicht überprüft werden, da durch diese beiden Substanzen die

Fluoreszenz des GFP stark verringert wurde, sodass das HA-GFP-SCL14 Fusionsprotein im Fluoreszenzmikroskop nicht mehr sichtbar war.



#### Abbildung 5.2: Mechanismus der Entstehung des SA-Radikals

Durch die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser (1) wird die Katalase vom Ferrienzym zu Komponente 1 oxidiert. Durch die Oxidation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{O}_2$  (2) wird das Ferrienzym regeneriert und der Katalytische Zyklus abgeschlossen. Durch die Übertragung eines Elektrons von SA auf Komponente 1 (3) wird diese in die inaktive Komponente 2 überführt und es entsteht ein SA-Radikal, welches mit einer ungesättigten Fettsäure reagieren kann, wodurch die Lipidperoxidationskettenreaktion in Gang gesetzt wird. Bei hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen kann Komponente 2 durch SA, unter erneuter Bildung eines SA-Radikals zum Ferrienzym regeneriert werden. Verändert nach (Anderson et al. 1998).

Die durch die Oxidation von Fettsäuren durch das SA-Radikal oder andere elektrophile Substanzen entstandenen Lipidderivate können ihre Wirkung in der Zelle potentiell auf zwei unterschiedliche Arten entfalten. Zum einen indirekt durch die Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes, da für die Entgiftung dieser oxidierten Fettsäuren Reduktionsäquivalente in Form von NADPH und FMN verbraucht werden (Farmer & Davoine 2007) und durch die direkte Reaktion mit der Thiolgruppe des Glutathions, wodurch in der Zelle ein oxidatives Milieu erzeugt wird. Zum Anderen können RES direkt nukleophile Gruppen in Biomolekülen oxidieren und diese so schädigen (Farmer & Davoine 2007).

Der genaue Wirkmechanismus von TIBA innerhalb der Zelle ist noch nicht bekannt, jedoch ist es durchaus wahrscheinlich, dass TIBA ebenfalls zur Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes führt oder die Modifikation von Biomolekülen auslöst, da der Benzolring des Moleküls durch die drei Elektronen ziehenden Iod-Substituenten einen elektrophilen Charakter erhält und in einer nukleophilen aromatischen Substitution mit nukleophilen Gruppen reagieren kann.

Das gemeinsame Charakteristikum von OPDA, SA und TIBA ist also, dass sie in der Zelle oxidativen Stress auslösen. Dieser Stress und eine daraus resultierende mögliche Redoxmodifikation reaktiver Cysteine von SCL14 könnte demnach das Ereignis sein, welches die Kernakkumulation von SCL14 auslöst.

Statt der kovalenten Modifikation reaktiver Cysteine könnte die Aktivierung von SCL14 auch durch die direkte, reversible Bindung von Xenobiotika und durch Xenobiotika-induzierte kleine Moleküle erfolgen. Für Pflanzen konnte solch ein Mechanismus der reversiblen, nichtkovalenten Bindung von Xenobiotika an Rezeptoren bisher noch nicht nachgewiesen werden, jedoch sind Beispiele aus dem Tierreich bekannt. So bindet der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) aromatische Toxine, wie Dioxin, im Cytoplasma, was zur Translokation des Rezeptors in den Zellkern und der daraus resultierenden Aktivierung von Stressgenen wie Cytochrom P450 Monooxygenasen führt. AHRs sind sowohl aus Wirbellosen als auch aus Wirbeltieren bekannt (McMillan & Bradfield 2007).

Zhang et al. postulierten, dass die pflanzlichen GRAS-Proteine nicht, wie bisher angenommen, mit den STAT-Proteinen verwandt sind, sondern mit bakteriellen GRAS-Proteinen, welche Methyltransferasen darstellen (Zhang et al. 2012). Zwar hätten die pflanzlichen GRAS-Proteine größtenteils die Methyltransferaseaktivität verloren, jedoch seien die konservierten Aminosäuren, die für die Substratbindung notwendig seien, noch vorhanden.



### **Abbildung 5.3: Sequenzvergleich von GRAS-Domänen pflanzlicher und bakterieller GRAS-Proteine mit Methyltransferasen**

Die konservierten Aminosäuren der Rossmannfalte sind blau, die für die Bindung des S-Adenosylmethionins notwendigen Aminosäuren rot und die für die Substratbindung notwendigen Aminosäuren lila hinterlegt. Während die Aminosäuren der Rossmannfalte und die für die Substratbindung notwendigen Aminosäuren in den meisten pflanzlichen GRAS-Proteinen konserviert sind, sind die für die Bindung des S-Adenosylmethionins notwendigen Aminosäuren bei vielen pflanzlichen GRAS-Proteinen nicht mehr vorhanden (Zhang et al. 2012).

Somit könnten viele GRAS-Proteine noch eine Bindeaktivität für kleine Moleküle aufweisen. Daher könnte auch SCL14 möglicherweise in der Lage sein, kleine Moleküle wie SA oder TIBA zu binden, was dann zu einer Aktivierung des Proteins führen könnte. Allerdings würde eine Aktivierung durch eine breite Palette von Xenobiotika eine sehr geringe Substratspezifität erfordern, da Xenobiotika strukturell sehr divers sein können, wie zum Beispiel SA und OPDA. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass SCL14 nicht direkt die ursprünglichen Xenobiotika bindet, sondern die aufgrund deren Einwirkung entstandenen sekundären Substanzen. Zum Beispiel könnte Malondialdehyd (MDA) ein Kandidat für ein solches Sekundärmolekül sein. MDA ist eines der häufigsten Produkte der Lipidperoxidation in Pflanzenzellen und induziert die Expression von Stressassoziierten Genen wie GSTs (Weber et al. 2004). Die Hypothese, dass Xenobiotika oder durch chemischen Stress induzierte Moleküle direkt an SCL14 binden, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, jedoch konnte gezeigt werden, dass zwei der im Protein vorhandenen Cysteine für die Funktionalität von SCL14 essentiell sind.

## **5.2 Die Cysteine C400 und C691 sind essentiell für die Funktionalität von SCL14**

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, wird die Akkumulation von SCL14 im Zellkern durch Substanzen induziert, die in der Zelle oxidativen Stress auslösen können. Die Wahrnehmung dieses oxidativen Stresses durch Sensormoleküle kann durch die Redox-Modifikation von Cysteinen in diesen Proteinen erfolgen (Spoel & Loake 2011; Spadaro et al. 2010). Allerdings sind nicht alle Cysteine in gleicher Weise empfänglich gegenüber solchen Modifikationen, da ihre Reaktivität auch durch die sie umgebenden Aminosäuren beeinflusst wird (Spoel & Loake 2011). Um die mögliche Beteiligung der Cysteine von SCL14 an der Regulation des Proteins zu untersuchen, wurden Mutanten erstellt, bei denen eines oder mehrere Cysteine gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht wurden. Durch die Mutation der fünf

Cysteine in der GRAS-Domäne von SCL14 (Abb. 4.11) wurde ein Protein erstellt, welches nicht mehr in den Zellkern importiert wird (Abb. 4.18) und sowohl die Fähigkeit verloren hat, in einem transienten Protoplastensystem den *GSTU7*-Promotor zu aktivieren (Abb. 4.13) als auch mit TGA2 und dem Kernexportrezeptor XPO1a zu interagieren (Abb. 4.16). Durch die Erstellung von Doppelmutanten konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den für die Aktivierung des *GSTU7*-Promotors (Abb.4.15) und für die Interaktion mit TGA2 und XPO1a essentiellen Cysteinen um C400 und C691 handelt (Abb. 4.16). Ob diese Mutante genau wie die Mutante, in der alle fünf Cysteine der GRAS-Domäne mutiert waren, in der Kernlokalisation beeinträchtigt ist, konnte bisher noch nicht getestet werden. Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise die beiden Cysteine die Aktivität von SCL14 beeinflussen können. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt erwähnt, lösen SA, TIBA und OPDA oxidativen Stress aus, der zur Redox-Modifikation reaktiver Cysteine in Proteinen führen kann. Beispiele für die Regulation von Transkriptionsfaktoren bzw. Transkriptionskoaktivatoren durch solche Redox-Modifikationen sind sowohl von Tieren und Pilzen, als auch von Bakterien bekannt. So wird der Säugetiertranskriptionsfaktor Nrf2 von seinem Interaktionspartner Keap1 im Cytoplasma zurückgehalten und für den Abbau durch das Proteasom markiert. Nach der Oxidation kritischer Cysteine in Keap1 wird die Interaktion der beiden Proteine unterbunden, wodurch Nrf2 stabilisiert wird und in den Zellkern gelangen kann um die Genexpression zu aktivieren (Sato et al. 2006; Dinkova-Kostova et al. 2005). Solch einen Mechanismus könnte man sich ebenfalls für SCL14 vorstellen, wobei die Redox-Modifikation entweder an SCL14 oder an dem noch unbekanntem interagierenden Protein stattfinden könnte. Allerdings ist diese Retention im Cytoplasma nicht vollständig, da SCL14 bereits im uninduzierten Zustand in den Kern transportiert wird, was daran zu erkennen ist, dass die Kernakkumulation allein durch LMB ohne zusätzlichen, oxidativen Stimulus hervorgerufen werden kann (Abb. 4.2) und das JA im Wildtyp und nicht in der *sc14/33* Mutante in der Lage ist, die Expression von *GSTU7* zu induzieren, ohne dass es zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern kommt (Abb. 4.4 und 4.25). Dies könnte bedeuten, dass ein gewisser Prozentsatz von SCL14 und seinem Interaktionspartner bereits basal oxidiert ist, oder dass die Mengen des Retentionsfaktors limitiert sind.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es den Transkriptionsfaktor YAP1p, welcher für die Antwort auf oxidativen Stress verantwortlich ist. Im uninduzierten

Zustand findet ein konstanter Austausch des Proteins zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern statt. Nach der Oxidation von vier Cysteinen unter oxidativem Stress und der daraus resultierenden Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken wird das Kernexportsignal maskiert und YAP1p akkumuliert im Zellkern (Kuge et al. 1997; Menezes et al. 2004). Da sowohl YAP1p als auch SCL14 im uninduzierten Zustand kontinuierlich zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma hin und her wechseln und bei oxidativem Stress im Zellkern akkumulieren, ist es denkbar, dass auch bei der Regulation beider Proteine Parallelen gibt, dass also durch die Oxidation von Cysteinen die Kernexportsequenz von SCL14 nicht mehr für den Kernexportapparat zugänglich ist, was dann zur Kernakkumulation führt.

Aus *Escherichia coli* ist der durch Redox-Modifikationen regulierte Transkriptionsfaktor OxyR bekannt. Ein reaktives Cystein in diesem Protein kann durch unterschiedliche Substanzen oxidiert werden, wodurch eine Sulphensäure, ein gemischtes Disulfid oder ein Nitrosocystein gebildet werden, was jeweils zu unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften führt (Kim et al. 2002). Auch diese Art der Regulation wäre für SCL14 vorstellbar. Zwar bindet SCL14 nicht selbst an DNA, jedoch könnte durch Konformationsänderungen, die durch eine Redox-Modifikation eines oder mehrerer Cysteine erfolgen, die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen positiv oder negativ beeinflusst werden. Zum Beispiel könnte die Interaktion mit dem Kernimportapparat erleichtert werden, was dann zu einem verstärkten Kernimport führen würde, oder die Interaktion mit dem Kernexportapparat könnte erschwert werden, was dann zu einer Herabsetzung des Kernexports führen würde, oder die Interaktion mit einem cytosolischen Retentionsfaktor könnte moduliert werden.

Da die Einzelmutanten nicht in messbarer Weise in der Aktivität beeinträchtigt waren, scheint die Funktion der beiden Cysteine redundant zu sein. Da jedoch ein Cystein bereits im uninduzierten Zustand oxidiert zu sein scheint und ein weiteres anscheinend nach oxidativem Stress oxidiert wird (Abb. 4.30), besteht auch die Möglichkeit, dass ein kooperativer Effekt der beiden Cysteine bei der Regulation der Aktivität von SCL14 vorliegt. Ein solcher kooperativer Effekt zweier Cysteine wurde bei dem bereits erwähnten Transkriptionsfaktor aus *E. coli*, OxyR, beobachtet (Kim et al. 2002). OxyR bindet bereits in seiner reduzierten Form an die DNA, was jedoch noch nicht zu einer Aktivierung der Genexpression führt (Kim et al. 2002). Diese wird erst nach der Oxidation von OxyR durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder GSNO aktiviert (Hausladen et al.

1996). Bei der Aminosäure, die durch  $H_2O_2$  oder GSNO oxidiert wird, handelt es sich um Cystein 199 und der Austausch dieser Aminosäure gegen ein Serin führt zum Verlust der Transkriptionsfaktoraktivität von OxyR. (Kim et al. 2002). Ebenfalls an der Regulation von OxyR beteiligt ist das Cystein 208. Allerdings wird diese Aminosäure nicht oxidativ modifiziert und ein Austausch führt auch nicht zu einem vollständigen Verlust der Aktivität, sondern nur zu deren Verminderung. Möglicherweise stabilisiert C208 die posttranslationale Modifikation von C199 auf chemische Weise oder durch einen Effekt auf die Konformation des Proteins (Kim et al. 2002).

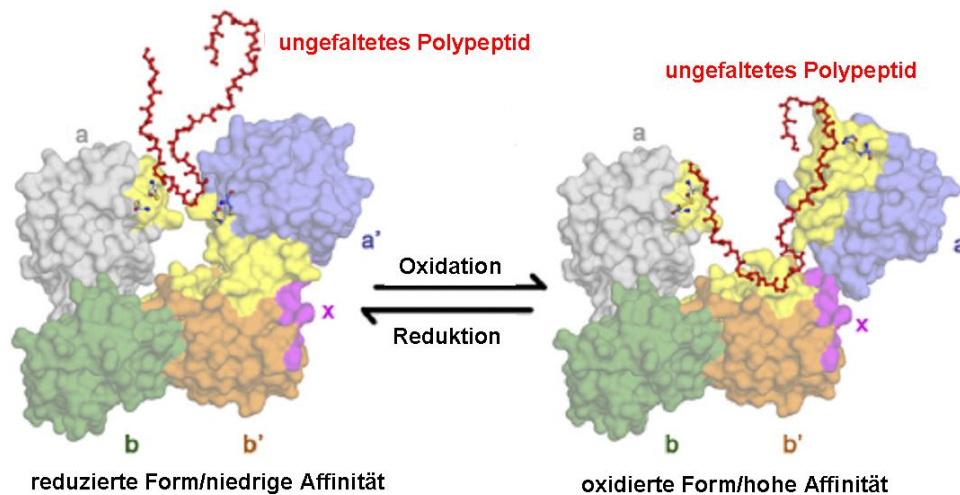
Das Modell von OxyR ist nicht eins zu eins auf SCL14 übertragbar, da C400 und C691 in ihrer Funktion austauschbar zu sein scheinen, während dies bei OxyR nicht der Fall ist. Dennoch ist es denkbar, dass die Oxidation der beiden Cysteine in kooperativer Weise einen Einfluss auf die Konformation von SCL14 hat, welche die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen könnte. Ein Modell für eine derartige Regulation wäre, dass bereits die Oxidation eines der beiden kritischen Cysteine für die Interaktion von SCL14 mit TGA-Faktoren, dem Kernimportapparat und dem Kernexportapparat sowohl notwendig als auch ausreichend ist. Dies wäre unter uninduzierten Bedingungen der Fall, wenn ein kontinuierlicher Austausch des Proteins zwischen Zellkern und Cytoplasma stattfindet. Durch die Einwirkung von oxidativem Stress wird das zweite Cystein oxidiert, wodurch die Interaktion mit dem Kernimportapparat erleichtert werden könnte, was dann, bei einer gleich bleibenden Exportrate, zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern führen würde. Alternativ könnte die Oxidation des zweiten Cysteins auch dazu führen, dass die Interaktion mit dem Kernexportapparat verhindert wird, was bei gleich bleibendem Import ebenfalls zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern führen würde.

Zwar konnte im Protoplastensystem kein Unterschied in der Fähigkeit der Einfachmutanten den *GSTU7*-Promotor zu aktivieren, im Vergleich zum Wildtypprotein festgestellt werden, jedoch ist für die Aktivierung dieses Promotors die basale Menge von SCL14 im Zellkern ausreichend, da JA zwar dessen Aktivierung in Abhängigkeit von SCL14 induziert (Abb. 4.25), nicht jedoch die Akkumulation von SCL14 im Zellkern (Abb. 4.4). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu testen, ob die C400S Mutante und die C691S Mutante noch mit TGA2 und XPO1a interagieren können, ob sie nach SA-, TIBA- oder OPDA-Stimulus noch im Zellkern akkumulieren und ob sie auch in der Lage sind, im Protoplastensystem den Promotor eines Gens zu aktivieren, welches nicht durch JA induziert wird, wie zum Beispiel



*UGT73B3*, *AT3G04130* oder *AT5G61800* (Abb. 4.25). Sofern die beiden Einfachmutanten noch in der Lage sind, mit TGA2 und XPO1a zu interagieren, jedoch nicht mehr im Zellkern akkumulieren und auch keinen nicht durch JA induzierbaren Promotor aktivieren können, wäre dies ein Hinweis darauf, dass die Oxidation des zweiten Cysteins in der Tat für die Kernakkumulation und die daraus resultierende Aktivierung der Genexpression verantwortlich ist.

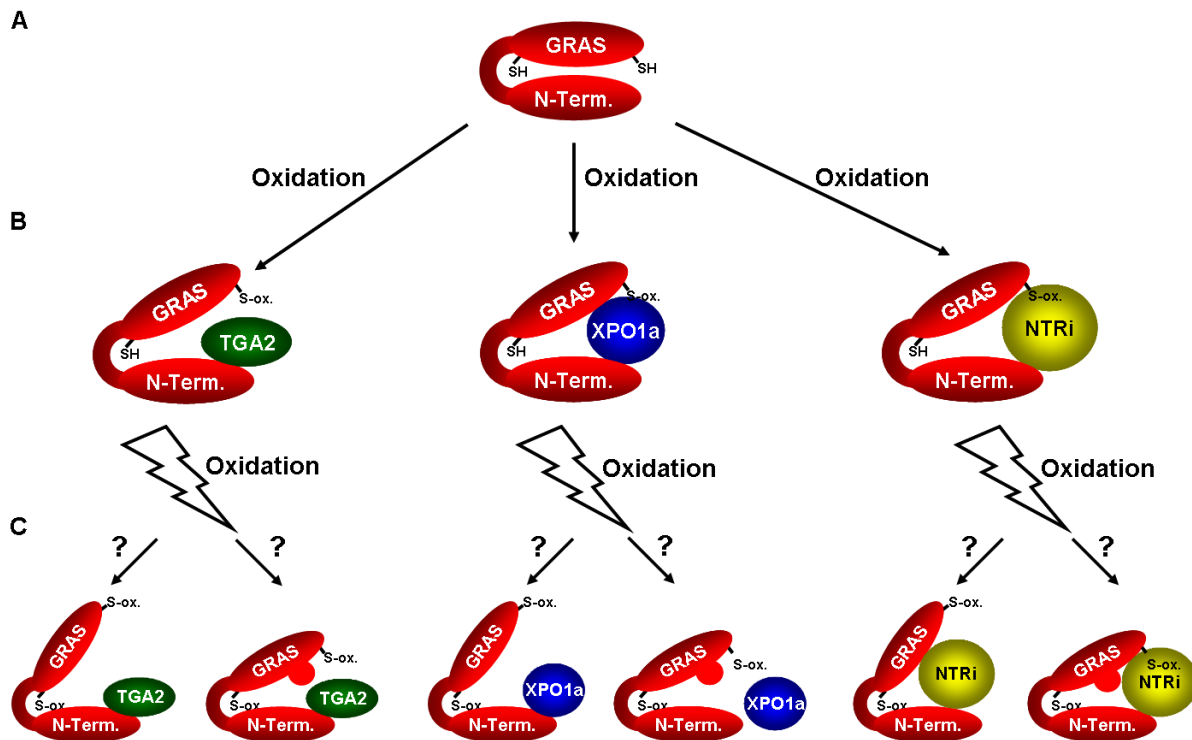
Die vollständige Reduktion des Proteins, die durch die gleichzeitige Mutation der beiden Cysteine C400 und C691 imitiert wird, könnte deswegen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust von SCL14 führen, weil die Modifikation zumindest eines der beiden Cysteine notwendig ist, um die Interaktionsdomäne von SCL14 für andere Proteine zugänglich zu halten. Ein Protein, dessen Proteininteraktionsdomäne im reduzierten Zustand unzugänglich ist und nach der Oxidation des Proteins frei gelegt wird, ist die humane Protein Disulfid Isomerase (hPDI). Die hPDI ist ein Chaperon, welches unter anderem an der Formation, der Auflösung und der Reorganisation von Disulfidbrücken (Freedman et al. 2002) und der ER-gebundenen Degradation falsch gefalteter Proteine beteiligt ist (Molinari et al. 2002; Lee et al. 2010). Das Protein besteht aus den vier Thioredoxin-ähnlichen Domänen a, b, a' und b', einem x-Linker und einer C-terminalen sauren Schwanzdomäne (Alanen et al. 2003; Pirneskoski et al. 2004; Freedman et al. 1998). In ihrer reduzierten Form nimmt die hPDI eine dicht gepackte Konformation ein, was dazu führt, dass die Substrataffinität gering ist. Durch die Oxidation zweier Cysteine im aktiven Zentrum der a'-Domäne nimmt die hPDI eine offenere Konformation ein, wodurch die Substrataffinität und die katalytische Aktivität erhöht werden (Abb. 5.4) (Wang et al. 2012)



**Abbildung 5.4: Redox-induzierte Konformationsänderung der humanen Protein Disulfid Isomerase**

Schematisches Modell der Redox-regulierten Chaperonaktivität der hPDI: Die reduzierte hPDI nimmt eine kompakte Konformation ein, wodurch nur kleine hydrophobe Bereiche für die Substratbindung exponiert werden. Oxidation des aktiven Zentrums der a'-Domäne induziert den Übergang in eine offenere Konformation, was zu einer verstärkten Exposition von hydrophoben Bereichen für die Substratbindung führt. Die a, a', b, b' und x Domänen sind grau, blau, grün, orange und magenta dargestellt, hydrophobe Bereiche, die die Substratbindung vermitteln sind gelb dargestellt. Verändert nach (Wang et al. 2012).

Analog hierzu könnte sich bei SCL14 die Oxidation der Cysteine C400 und C691 auf die Position der GRAS-Domäne, relativ zum N-Terminus, auswirken. Dies würde erklären, warum sich die Mutation der beiden Cysteine, die sich in der C-terminalen GRAS-Domäne befinden, auf die Interaktion mit TGA2 und XPO1a auswirkt, obwohl die Interaktion von SCL14 mit diesen beiden Proteinen über den N-Terminus vermittelt wird (J. Oberdiek; unveröffentlichte Daten). Im reduzierten Zustand könnten der N-Terminus und die GRAS-Domäne von SCL14 in einer geschlossenen Konformation vorliegen, wodurch die für die Interaktion notwendigen Bereiche im N-Terminus durch die GRAS-Domäne verdeckt würden. Durch die Oxidation eines der beiden Cysteine würde SCL14 in eine halb offene Konformation übergehen, wodurch die Interaktion mit TGA2, dem Kernimportapparat und XPO1a ermöglicht wird. Durch die Oxidation des zweiten Cysteins geht SCL14 in eine offene Konformation über, wodurch die Interaktion mit dem Kernimportapparat vereinfacht werden könnte, die in der halb offenen Konformation möglicherweise nur eingeschränkt möglich ist, während für die maximale Interaktion mit TGA2 und XPO1a bereits die halb offene Konformation ausreichend sein könnte (Abb. 5.5). Alternativ könnte die Oxidation des zweiten Cysteins eine Konformationsänderung von SCL14 auslösen, die die Interaktion mit XPO1a verhindert.



**Abbildung 5.5: Schematisches Modell der kooperativen Regulation von SCL14 durch die Redox-Modifikation der Cysteine C400 und C691**

A: Die reduzierte Form von SCL14 liegt in der geschlossenen Konformation vor, die weder mit TGA2 noch mit XPO1a noch mit dem Kernimportrezeptor (NTRi) interagieren und weder in den Kern noch zurück ins Cytoplasma transportiert werden kann. Da bereits im uninduzierten Zustand ein kontinuierlicher Austausch von SCL14 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma stattfindet, liegt diese Form des Proteins vermutlich nur in geringer Menge oder gar nicht vor.

B: Nach der Oxidation eines der beiden Cysteine C400 oder C691 geht SCL14 in die halb offene Konformation über, was die Interaktion mit TGA2, XPO1a und NTRi den Austausch von SCL14 zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma ermöglicht.

C: Nach der Oxidation des zweiten Cysteins unter oxidativen Stressbedingungen könnte SCL14 in die offene Konformation übergehen. Die Interaktion von SCL14 mit TGA2 und XPO1a wird hierdurch nicht beeinflusst, da für diese die halb offene Konformation ausreichend ist. Die Interaktion mit NTRi ist in dieser Konformation, im Vergleich zur halb offenen Konformation jedoch erleichtert, was zu einer Verstärkung des Kernimports und dadurch zu einer Akkumulation von SCL14 im Zellkern führt. Alternativ könnte die Oxidation des zweiten Cysteins eine Konformationsänderung bei SCL14 auslösen, die die Interaktion mit XPO1a verhindert, die Interaktion mit TGA2 und NTRi jedoch nicht beeinflusst.

Alle vier Konformationen von SCL14 wurden bisher noch nicht beobachtet und sind somit rein hypothetisch.

SH: reduziertes Cystein; S-ox.: oxidiertes Cystein; GRAS: GRAS-Domäne von SCL14; N-Term.: N-Terminus von SCL14; Die Blitze symbolisieren oxidativen Stress, der zur Oxidation des zweiten Cysteins führt.

Zumindest die Oxidation, die zum Übergang von der geschlossenen in die halb offene Konformation führt, muss auch in der Hefe möglich sein und erfolgen. Würde SCL14 in der Hefe vollständig reduziert vorliegen und sich deshalb in der geschlossenen Konformation befinden, könnte die Interaktion von SCL14 mit TGA2 und XPO1a nicht in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment nachgewiesen werden.

### **5.3 SA induziert Gene der Stressantwort in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana***

Fode et al. konnten zeigen, dass SCL14 in Blättern für die TIBA-induzierte Expression von Genen verantwortlich ist, die an der Antwort auf toxischen Stress beteiligt sind (Fode et al. 2008). Darunter waren Gene, die an den ersten beiden Abschnitten des pflanzlichen Detoxifikationsprogrammes beteiligt waren, wie die Cytochrom P450 Monooxygenase *CYP81D11*, die Glutathion S-Transferase *GSTU7* und die Glykosyltransferase *UGT73B3*. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SCL14 auch in Wurzeln an der Regulation solcher Gene beteiligt ist. Die drei genannten Gene und weitere, die zu den gleichen Genfamilien gehören, wurden in dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray Experiment durch SA SCL14-abhängig induziert, jedoch konnte die Expression des Cytochrom *CYP81D11* in Wurzeln nicht in unabhängigen Experimenten durch quantitative Realtime PCR bestätigt werden. Für *GSTU7* und *UGT73B3* wurde die Induktion durch SA jedoch mittels quantitativer Realtime PCR bestätigt und es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Gene auch durch TIBA in der Wurzel induziert wurden.

Die in diesem Microarray Experiment in Col-0 durch SA SCL14-abhängig induzierten Gene können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Expression der Gene der ersten Gruppe unterscheidet sich basal nicht zwischen Col-0 und der *sc14/33* Mutante und diese Gene werden in der Mutante nicht durch SA induziert (Abb. 4.22, Gruppe 1). Die SA-Induktion dieser Gene kann als strikt SCL14-abhängig bezeichnet werden. Die beiden Gene aus dieser Gruppe, deren Expression näher untersucht wurde, *AT3G04130* und *AT5G61800*, werden zwar im Wildtyp durch SA und TIBA SCL14-abhängig induziert (Abb. 4.22 und 4.24), jedoch enthalten die Promotoren dieser beiden Gene keine Bindestellen für TGA-Faktoren (Tab. 4.3), obwohl diese um den Faktor 1,5 in den Promotoren der Gruppe 1 angereichert sind (Tab. 4.2). Die Regulation der beiden Gene durch den SCL14/TGA-Komplex muss also indirekt erfolgen. Dies könnte über Transkriptionsfaktoren aus der NAC-Familie geschehen, da in beiden Promotoren eine Bindestelle für NAC-Transkriptionsfaktoren vorhanden ist (Tab. 4.3) und mehrere NAC-Faktoren SCL14-abhängig reguliert werden. Beispielsweise konnte Neena Ratnakaran zeigen, dass NAC102, ATAF2, NAC032 und ATAF1 durch TIBA SCL14-abhängig induziert werden (Ratnakaran 2014). Dabei zeigen NAC102 und ATAF2 ein Expressionsmuster, das dem der Gene der Gruppe 1

entspricht. Somit könnten diese beiden Transkriptionsfaktoren die Verbindung zwischen SCL14 und *AT3G04130* und *AT5G61800* herstellen.

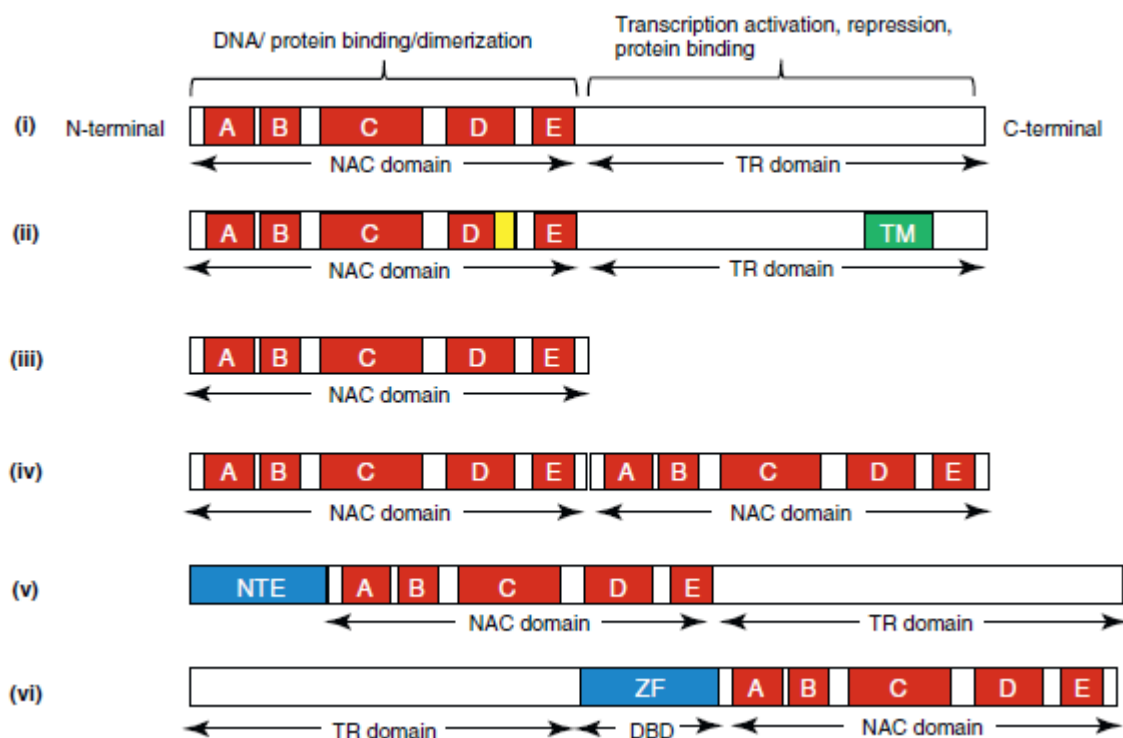
Die Expression der Gene der zweiten Gruppe ist in der Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, bereits basal reduziert. Nach SA-Behandlung erfolgt bei diesen Genen auch in der Mutante eine Induktion der Expression. Die absolute Expressionsstärke dieser Gene ist in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp verringert, jedoch ist der relative Induktionsfaktor in etwa gleich (Abb. 4.22, Gruppe 2). Interessanterweise sind in den Promotoren dieser Gruppe die TGA-Bindestellen 5,6-fach angereichert und im *GSTU7* Promotor befindet sich sogar ein perfektes Palindrom. Dies könnte erklären, dass schon basale Mengen des SCL14/TGA-Komplexes die Aktivität dieser Promotoren beeinflussen. Da es im Wildtyp im Vergleich zur *sc14/33* Mutante nicht zu einer Hyperinduktion nach SA-Behandlung kommt, scheint SCL14 für diese Promotoren lediglich als Verstärker zu dienen, wobei das Ausmaß der Verstärkung unabhängig von der Kernakkumulation zu sein scheint. Somit müssen andere Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung verantwortlich sein. In den Promotoren der Gene der Gruppe 2 sind *G-Boxen* und *W-Boxen* angereichert, die in den Promotoren der Gene der Gruppe 1 nicht angereichert sind (Tab. 4.2). Es könnten also *G-Box*-bindende Faktoren wie beispielsweise MYC2 und WRKY-Transkriptionsfaktoren, welche an die *W-Box* binden, für die unterschiedliche Regulation verantwortlich sein. Da die Promotoren von *GSTU7* und *UGT73B3* keine *G-Box* enthalten, kommen bei diesen beiden Genen lediglich WRKY-Transkriptionsfaktoren dafür in Frage.

Das Gen *GSTU7* ist zusätzlich zu SA und TIBA auch durch JA induzierbar, wodurch es sich von *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* unterscheidet (Abb. 4.25). Da der Promotor des Gens jedoch keine *G-Box* enthält, welche für die direkte Regulation durch JA notwendig ist (Köster et al. 2012), muss dieses indirekt geschehen. Auch hierfür kommen WRKY-Transkriptionsfaktoren in Frage, da deren Transkription häufig JA-reguliert ist (Pandey & Somssich 2009).

## **5.4 SCL14 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor NAC017**

Da die Transkriptmenge von SCL14 nach SA-Behandlung nicht zunimmt (Anhang Tab. 6.3), erfolgt die Aktivierung der SCL14 Zielgene nicht durch die Neusynthese von SCL14 unter induzierenden Bedingungen. Vielmehr scheint für diese Aktivierung eine Modifikation von SCL14 notwendig zu sein. Diese Modifikation kann in einer posttranslationalen Modifikation von SCL14 oder des TGA-Faktors, oder in der Interaktion des SCL14/TGA-Komplexes mit einem weiteren Protein bestehen. In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass die Cysteine C400 und C691 und wahrscheinlich deren Redox-Modifikation für die Regulation der Aktivität von SCL14 notwendig sind. Um Anhaltspunkte für die Regulation des SCL14/TGA-Komplexes durch die Interaktion mit einem weiteren Protein zu überprüfen, wurde mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System nach neuen Interaktionspartnern von SCL14 gesucht. Da SCL14 in diesem System bereits eine Autoaktivierung der Reportergene aufweist, wurde nur die C-terminale GRAS-Domäne als Köderprotein angeboten. In diesem Experiment wurde der Transkriptionsfaktor NAC017 als Interaktionspartner von SCL14 gefunden. Die Familie der NAC-Transkriptionsfaktoren zählt mit über 100 Mitgliedern zu den größten Familien pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren. Entsprechend der Größe der Genfamilie sind NAC-Transkriptionsfaktoren an zahlreichen Prozessen wie Wachstum und Entwicklung, Organbildung, Seneszenz (Souer et al. 1996; Aida et al. 1997; Xie et al. 2000), Pathogenabwehr (Jensen et al. 2007; Jensen et al. 2008; X. Wang et al. 2009; Bu et al. 2008; Seo et al. 2010) und der Reaktion auf abiotischen Stress beteiligt (Hu et al. 2006; Jeong et al. 2010). Kürzlich konnten die beiden NAC-Transkriptionsfaktoren ATAF1 und NAC032 als Zielgene von SCL14 identifiziert und deren Beteiligung an der Regulation der pflanzlichen Antwort auf xenobiotischen Stress nachgewiesen werden (Fode et al. 2008; Ratnakaran 2014). Da auch die vier in dieser Arbeit untersuchten SCL14 Zielgene, *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800*, in ihren Promotoren Bindemotive für NAC-Transkriptionsfaktoren aufweisen, wurde die Interaktion von SCL14 und NAC017 und der Einfluss von NAC017 auf die Expression dieser vier Gene eingehender untersucht. Der im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment gefundene Klon enthielt nicht die komplette cDNA von NAC017, sondern nur ein Fragment, welches den C-terminalen Teil des Proteins kodiert (Abb. 4.32). Die GRAS-Domäne von SCL14 interagiert jedoch auch mit dem vollständigen NAC017-Protein (Abb. 4.34), allerdings ist diese Interaktion etwa um den Faktor fünf schwächer als die Interaktion mit dem

C-terminalen Fragment (Abb. 4.34). Die NAC-Domäne, anhand welcher die Einordnung der Proteine in die Familie der NAC-Transkriptionsfaktoren erfolgt, befindet sich im N-Terminus der Proteine (Aida et al. 1997). Dieser Bereich der NAC-Proteine ist stark konserviert und vermittelt sowohl die DNA-Bindung der NAC-Faktoren als auch die Dimerisierung verschiedener NAC-Proteine. Sie kann in die fünf Unterdomänen A bis E unterteilt werden, wobei die Unterdomänen C und D für die DNA-Bindung, die Unterdomäne A für die Dimerbildung und die Unterdomänen B und E für die funktionelle Diversität verantwortlich sind (Abb. 2.6) (Puranik et al. 2012).



**Abbildung 5.6: Domänenstruktur der NAC-Transkriptionsfaktoren**

(i): Typisches NAC-Protein mit der konservierten NAC-Domäne im N-terminus, welche in fünf Unterdomänen (rot) unterteilt ist. Diese Domäne ist für die DNA-Bindung und Protein-Protein Interaktionen sowie Dimerbildung verantwortlich. Der C-Terminus ist weniger konserviert und dient als potentiell zur Regulation der Transkription und kann sowohl eine aktivierende als auch eine unterdrückende Funktion haben.

(ii): Manche NAC-Proteine weisen eine Repressordomäne (gelb) auf und der C-Terminus kann eine Transmembrandomäne enthalten (grün).

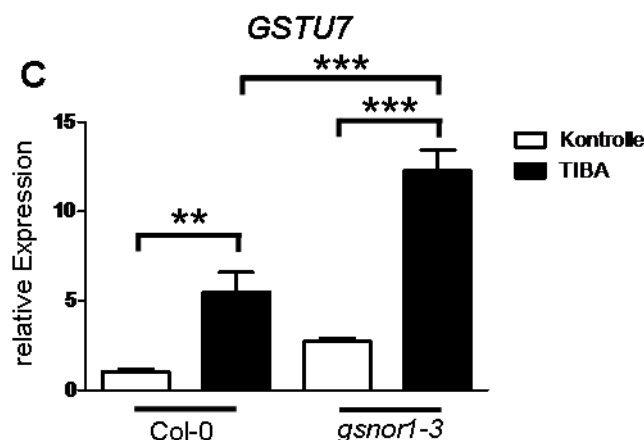
Einige NAC-Faktoren bestehen nur aus der NAC-Domäne (iii) oder einem Tandem aus zwei dieser Domänen (iv). Am N-Terminus kann der NAC-Domäne eine Extension vorgelagert sein (NTE) (v), oder die NAC-Domäne kann sich im C-Terminus befinden, während die Domäne zur Regulation der Transkription den C-Terminus bildet und ein Zinkfingermotiv (ZF) enthält, welches die DNA-Bindung vermittelt (vi). (Puranik et al. 2012)

Da die Interaktion zwischen dem vollständigen NAC-Protein und der SCL14 GRAS-Domäne schwächer ist als die Interaktion des C-Terminus mit der SCL14 GRAS-

Domäne, scheint die NAC-Domäne für die Interaktion der beiden Proteine nicht notwendig zu sein. Die NAC-Domäne könnte auch zur Verringerung der Interaktionsstärke beitragen, da sich NAC-Dimere bilden könnten, deren Interaktion mit SCL14 aufgrund sterischer Behinderung möglicherweise schwächer ist. Der C-Terminus der NAC-Transkriptionsfaktoren ist, im Gegensatz zur NAC-Domäne, kaum konserviert und für die Spezifität der Interaktion mit anderen Proteinen sowie für die Aktivierung bzw. die Repression der Genexpression verantwortlich. Um die Bedeutung von NAC017 für die Expression der SCL14 Zielgene zu überprüfen, wurde die Expression der SCL14 Zielgene *GSTU7*, *UGT73B3*, *AT3G04130* und *AT5G61800* in einer *nac017* Knockoutmutante nach SA-Behandlung untersucht. Für die Gene *GSTU7*, *UGT73B3* und *AT3G04130* konnte kein Unterschied in der Genexpression zwischen dem Wildtyp und der Mutante beobachtet werden. Alle drei Gene werden sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante durch die Behandlung mit SA induziert. Allerdings ist die Induktion von *UGT73B3*, im Gegensatz zu *GSTU7* und *AT3G04130*, nicht signifikant (Abb. 4.38). Ein Unterschied in der Expression zwischen Col-0 und *sc14/33* ist jedoch für das Gen *AT5G61800* zu beobachten, welches in der *nac017* Mutante hyperinduziert ist. Die SA-Induktion dieses Gens scheint also durch NAC017 reprimiert zu werden. Eine leichte Tendenz zur Hyperinduktion ist auch bei *GSTU7* und *AT3G04130* zu beobachten, allerdings ist der Unterschied in der Induktion zwischen Wildtyp und Mutante für diese beiden Gene nicht signifikant. Ein deutlicherer Effekt wäre möglicherweise in einer Mehrfachmutante zu beobachten, da mehrere redundante NAC-Faktoren an der Regulation dieser Gene beteiligt sein könnten. So könnte beispielsweise NAC016 als nächster Verwandter die Rolle von NAC017 übernehmen. Die Erstellung einer *nac016/017* Doppelmutante durch Kreuzung ist jedoch nicht möglich, da die beiden Gene auf Chromosom 1 direkt benachbart liegen, sodass die Wahrscheinlichkeit für ein Crossoverereignis zwischen den beiden Genen sehr gering ist. Eine weitere Möglichkeit, die Auswirkung von NAC017 auf die Expression der SCL14-Zielgene zu überprüfen, wäre die Herstellung von transgenen Pflanzen, die NAC017 überexprimieren. Sofern NAC017 wirklich einen negativen Regulator der SCL14 Zielgene darstellt, sollte die Expression der Gene nach SA-Behandlung in diesen Pflanzen, im Vergleich zum Wildtyp, verringert sein.



## 6 Anhang



**Abbildung 6.1: Expression von *GSTU7* in der *gsnor1-3* Mutante nach TIBA-Behandlung**

Die Behandlung mit 100  $\mu$ M TIBA erfolgte für acht Stunden an 4 Wochen alten, auf Erde unter Kurztagbedingungen angezogenen Pflanzen. Die relativen Transkriptmengen von *GSTU7* wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Für die RNA-Extraktion wurde Blattmaterial verwendet. Zur Normalisierung der Expression diente *UBQ5*. Die mittlere relative Expression der Wildtyp Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von 13 – 15 Hydroponikkulturen ( $\pm$  SEM) aus drei unabhängigen Experimenten. (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; Oneway ANOVA)

**Tabelle 6.1: Nach SA-Behandlung in Col-0 induzierte Gene der Gruppe 1**

Angegeben sind der Induktionsfaktor in Col-0 nach SA-Behandlung und der Unterschied der Expression zwischen Col-0 und *sc14/33* im uninduzierten Zustand, jeweils als log2-fache Induktion. Rot dargestellte Werte bedeuten eine Induktion, während grün dargestellte Werte eine Repression bedeuten. P-Werte über 0,05 sind gelb hinterlegt.

AGICode	Beschreibung	Col0 Kontr. / Col0 SA	adjusted P-Value	Col0 Kontr. / <i>sc14/33</i> Kontr.	adjusted P-Value
AT1G02880	TPK1	1.43	0.03	0.28	0.69
AT1G04090	Plant protein of unknown function (DUF946)	1.02	0.00	0.00	0.99
AT1G05820	SPPL5, ATSPPL5	1.02	0.01	0.16	0.65
AT1G06260	Cysteine proteinases superfamily protein	1.17	0.00	0.07	0.85
AT1G09710	Homeodomainlike superfamily protein	1.79	0.02	0.78	0.29
AT1G10820	Protein of unknown function (DUF3755)	2.63	0.01	1.19	0.21
AT1G12770	ISE1, EMB1586	1.17	0.00	0.32	0.26
AT1G12775	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	1.01	0.02	0.17	0.72
AT1G15125	Sadenosylmethioninedependent methyltransferases superfamily protein	1.42	0.00	0.73	0.02
AT1G17147	VQ motifcontaining protein	1.68	0.00	0.65	0.02
AT1G17170	ATGSTU24, GST, GSTU24	1.24	0.00	1.10	0.01
AT1G18250	ATLP1	1.04	0.02	0.73	0.08
AT1G20150	Subtilisinlike serine endopeptidase family protein	1.08	0.00	0.43	0.15

AT1G20925	Auxin efflux carrier family protein	1.10	0.00	0.07	0.84
AT1G21680	DPP6 Nterminal domainlike protein	1.31	0.00	1.08	0.00
AT1G23460	Pectin lyaselike superfamily protein	1.13	0.00	0.10	0.76
AT1G23465	Peptidase S24/S26A/S26B/S26C family protein	1.10	0.03	0.13	0.83
AT1G26800	RING/Ubox superfamily protein	1.54	0.01	0.01	0.99
AT1G27921	other RNA	1.04	0.04	0.47	0.34
AT1G33030	Omethyltransferase family protein	1.01	0.01	0.57	0.09
AT1G54160	NFYA5, NFYA5	1.13	0.03	0.23	0.66
AT1G63010	Major Facilitator Superfamily with SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domaincontaining protein	1.39	0.05	0.58	0.40
AT1G66080	unknown protein	1.00	0.01	0.37	0.23
AT1G69750	COX192, ATCOX192	1.05	0.02	0.92	0.05
AT1G72416	Chaperone DnaJdomain superfamily protein	1.06	0.01	0.05	0.92
AT1G72660	Ploop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	1.68	0.04	0.38	0.67
AT1G74310	ATHSP101, HSP101, HOT1	1.48	0.01	0.91	0.07
AT1G75270	DHAR2	1.20	0.00	0.29	0.41
AT1G76600	unknown protein	2.22	0.00	0.65	0.23
AT1G76680	OPR1	1.94	0.00	0.48	0.31
AT1G76690	OPR2, ATOPR2	1.74	0.00	0.34	0.32
AT1G77450	anac032, NAC032	1.18	0.01	1.23	0.02
AT1G79710	Major facilitator superfamily protein	1.73	0.00	0.25	0.35
AT1G79790	Haloacid dehalogenaselike hydrolase (HAD) superfamily protein	1.83	0.01	0.52	0.37
AT1G79820	SGB1	1.09	0.00	0.84	0.02
AT2G01200	IAA32	1.02	0.00	0.23	0.32
AT2G04440	MutT/nudix family protein	1.02	0.00	0.09	0.72
AT2G14160	RNAbinding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	1.31	0.00	0.30	0.39
AT2G19310	HSP20like chaperones superfamily protein	1.26	0.00	0.17	0.64
AT2G28210	ATACA2, ACA2	1.04	0.03	0.33	0.46
AT2G29480	ATGSTU2, GST20, GSTU2	1.32	0.01	1.11	0.04
AT2G29490	ATGSTU1, GST19, GSTU1	1.19	0.00	1.35	0.00
AT2G33100	ATCSLD1, CSLD1	1.06	0.00	0.13	0.60
AT2G36355	Family of unknown function (DUF662)	1.65	0.01	0.60	0.27
AT2G36390	SBE2.1, BE3	1.30	0.00	0.19	0.52
AT2G46320	Mitochondrial substrate carrier family protein	1.53	0.03	1.39	0.06
AT2G47895	other RNA	3.22	0.00	0.15	0.74
AT2G48121	unknown protein	1.00	0.00	0.01	0.99
AT3G01510	LSF1   like SEX4 1	1.51	0.00	0.24	0.28
AT3G01513	unknown protein	1.97	0.00	0.34	0.32
AT3G04130	Tetratricopeptide repeat (TPR)like superfamily protein	3.35	0.00	0.18	0.67
AT3G04140	Ankyrin repeat family protein	2.10	0.00	0.10	0.84
AT3G06400	CHR11   chromatinremodeling protein 11	2.89	0.03	2.00	0.11

AT3G07740	ADA2A	1.17	0.04	1.12	0.06
AT3G11560	LETM1like protein	1.05	0.03	0.28	0.55
AT3G12580	HSP70, ATHSP70	1.02	0.02	0.87	0.04
AT3G13030	hAT transposon superfamily protein	1.02	0.04	0.36	0.47
AT3G13065	SRF4   STRUBBELIGreceptor family 4	1.39	0.00	0.33	0.29
AT3G14660	CYP72A13	1.14	0.01	0.76	0.09
AT3G17340	ARM repeat superfamily protein	1.97	0.02	0.01	0.99
AT3G17660	AGD15	1.06	0.00	0.20	0.43
AT3G17670	tetratricopeptide repeat (TPR)containing protein	1.18	0.04	0.77	0.16
AT3G19800	Protein of unknown function (DUF177)	1.30	0.00	0.76	0.03
AT3G24500	MBF1C, ATMBF1C	1.32	0.02	0.63	0.23
AT3G24560	RSY3	1.29	0.00	0.34	0.24
AT3G28740	CYP81D1	1.94	0.03	0.76	0.36
AT3G45730	unknown protein	1.32	0.00	0.11	0.80
AT3G47090	Leucinerich repeat protein kinase family protein	1.15	0.00	0.29	0.40
AT3G51760	Protein of unknown function (DUF688)	1.50	0.01	0.03	0.96
AT3G56830	Protein of unknown function (DUF565)	1.08	0.04	0.37	0.49
AT3G56980	BHLH039, ORG3	1.17	0.00	0.25	0.42
AT3G60176	other RNA	1.24	0.00	0.82	0.02
AT4G03510	RMA1, ATRMA1	1.22	0.01	0.05	0.93
AT4G12400	Hop3	1.13	0.01	0.57	0.14
AT4G14030	SBP1	1.29	0.00	0.07	0.87
AT4G14040	EDA38, SBP2	1.39	0.00	0.37	0.31
AT4G17590	unknown protein	2.90	0.03	2.85	0.04
AT4G19060	Ploop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	1.39	0.00	0.13	0.78
AT4G19070	Putative membrane lipoprotein	1.11	0.00	0.11	0.73
AT4G19880	Glutathione Stransferase family protein	1.71	0.04	1.02	0.20
AT4G21990	APR3, PRH26, PRH26, ATAPR3	1.18	0.01	0.59	0.18
AT4G24460	CLT2	1.69	0.03	0.97	0.18
AT4G25450	ATNAP8, NAP8	2.33	0.01	2.50	0.02
AT4G27654	unknown protein	1.44	0.00	0.10	0.82
AT4G27657	unknown protein	1.19	0.00	0.20	0.53
AT4G28790	basic helixloophelix (bHLH) DNAbinding superfamily protein	1.24	0.02	0.44	0.40
AT4G29850	Eukaryotic protein of unknown function (DUF872)	2.16	0.04	1.19	0.23
AT4G32630	ArfGap/RecOlike zinc finger domaincontaining protein	1.16	0.00	0.03	0.95
AT4G33650	ADL2, DRP3A	2.00	0.00	1.32	0.04
AT4G34135	UGT73B2	1.77	0.01	0.26	0.72
AT4G36040	Chaperone DnaJdomain superfamily protein	1.28	0.00	0.28	0.47
AT4G36052	other RNA	1.38	0.01	0.14	0.80
AT4G38490	unknown protein	1.21	0.00	0.13	0.61
AT5G05410	DREB2A, DREB2	2.14	0.03	0.14	0.91
AT5G06820	SRF2	1.09	0.01	0.16	0.70

AT5G07860	HXXXDtype acyltransferase family protein	1.96	0.00	0.15	0.76
AT5G07880	SNAP29, ATSNAP29	1.29	0.00	0.04	0.92
AT5G07900	Mitochondrial transcription termination factor family protein	1.40	0.01	0.19	0.74
AT5G12280	SWAP (Suppressor of White A Pricot)/surp RNA binding domain containing protein	1.35	0.02	0.19	0.77
AT5G13080	WRKY75, ATWRKY75	1.01	0.05	0.80	0.12
AT5G14470	GHMP kinase family protein	2.29	0.01	0.19	0.84
AT5G14730	unknown protein	2.22	0.00	0.19	0.67
AT5G16300	Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein	1.47	0.00	0.61	0.17
AT5G18400	Cytokine induced antiapoptosis inhibitor 1, FeS biogenesis	1.33	0.05	1.23	0.07
AT5G26980	SYP41, ATSYP41, ATTLG2A	1.37	0.02	0.63	0.25
AT5G27010	ARM repeat superfamily protein	1.10	0.00	0.04	0.92
AT5G42965	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H like superfamily protein	1.02	0.01	0.16	0.68
AT5G51440	HSP20 like chaperones superfamily protein	1.12	0.02	1.25	0.02
AT5G57010	calmodulin binding family protein	1.12	0.02	0.18	0.71
AT5G60410	ATSIZ1, SIZ1	1.45	0.04	0.34	0.65
AT5G60440	AGL62   AGAMOUS like 62	1.17	0.03	0.09	0.89
AT5G61495	unknown protein	1.77	0.00	0.52	0.10
AT5G61800	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	1.19	0.02	0.07	0.92
AT5G64150	RNA methyltransferase family protein	1.01	0.02	0.23	0.61
AT5G64240	AtMC3, MC3	1.11	0.02	0.20	0.67
AT5G64250	Aldolase type TIM barrel family protein	1.33	0.00	0.87	0.02
AT5G66985	unknown protein	1.30	0.01	0.36	0.39

**Tabelle 6.2: Nach SA-Behandlung in Col-0 induzierte Gene der Gruppe 2**

Angegeben sind der Induktionsfaktor in Col-0 nach SA-Behandlung, der Unterschied der Expression zwischen Col-0 und *sc14/33* im uninduzierten Zustand, und der Induktionsfaktor in der *sc14/33* Mutante nach SA-Behandlung, jeweils als log<sub>2</sub>-fache Induktion. Rot dargestellte Werte bedeuten eine Induktion, während grün dargestellte Werte eine Repression bedeuten. P-Werte über 0,05 sind gelb hinterlegt.

AGICode	Beschreibung	Col-0 Kontr. / Col-0 SA	adjusted P-Value	Col-0 Kontr. / <i>sc14/33</i> Kontr.	adjusted P-Value	<i>sc14/33</i> Kontr. / <i>sc14/33</i> SA	adjusted P-Value
AT1G01720	ATAF1, ANAC002	1.074	0.014	1.297	0.012	1.342	0.008
AT1G17170	ATGSTU24, GST, GSTU24	1.240	0.002	1.099	0.009	0.475	0.202
AT1G21680	DPP6 Nterminal domainlike protein	1.309	0.000	1.080	0.003	0.394	0.147
AT1G77450	anac032, NAC032	1.176	0.015	1.226	0.020	0.562	0.287
AT2G29420	ATGSTU7, GST25, GSTU7	4.089	0.000	1.005	0.021	2.116	0.000
AT2G29480	ATGSTU2, GST20, GSTU2	1.320	0.013	1.108	0.039	0.508	0.404
AT2G29490	ATGSTU1, GST19, GSTU1	1.192	0.002	1.349	0.003	0.283	0.447
AT4G15550	IAGLU   indole3acetate betaDglucosyltransferase	2.468	0.000	1.399	0.013	2.371	0.001
AT4G34131	UGT73B3	3.327	0.000	1.482	0.019	1.694	0.010
AT4G34135	UGT73B2	2.741	0.001	1.547	0.034	0.690	0.393
AT5G63790	ANAC102, NAC102	2.575	0.000	1.676	0.006	2.718	0.000

**Tabelle 6.3: Im uninduzierten Zustand in Col-0 stärker Exprimierte Gene als in der *sc14/33* Mutante**

Angegeben sind der Unterschied der Expression zwischen Col-0 und *sc14/33* im uninduzierten Zustand, und der Induktionsfaktor in Col-0 nach SA-Behandlung, jeweils als log<sub>2</sub>-fache Induktion. Rot dargestellte Werte bedeuten eine Induktion, während grün dargestellte Werte eine Repression bedeuten. P-Werte über 0,05 sind gelb hinterlegt.

AGI-Code	Beschreibung	Col-0 Kontr. / <i>sc14/33</i> Kontr.	adjusted P-Value	Col-0 Kontr./ Col-0 SA	adjusted P-Value
AT1G01560	ATMPK11, MPK11	1.088	0.010	1.095	0.004
AT1G02850	BGLU11   beta glucosidase 11	1.207	0.004	0.628	0.028
AT1G07530	SCL14, ATGRAS2, GRAS2	4.423	0.000	0.212	0.321
AT1G13590	ATPSK1, PSK1	1.050	0.008	0.213	0.492
AT1G58320	PLAC8 family protein	1.277	0.028	0.119	0.851
AT1G60730	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	1.156	0.029	0.502	0.278
AT1G67980	CCOAMT   caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	1.917	0.023	0.378	0.632
AT1G68620	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1.213	0.028	0.495	0.303

AT1G79410	AtOCT5, 5-Oct   organic cation/carnitine transporter5	1.046	0.008	0.396	0.176
AT2G05400	Ubiquitin-specific protease family C19-related protein	1.392	0.013	0.751	0.090
AT2G05510	Glycine-rich protein family	1.720	0.004	0.254	0.546
AT2G15830	unknown protein	1.000	0.043	0.372	0.417
AT2G16430	PAP10, ATPAP10	2.076	0.023	1.333	0.092
AT2G18750	Calmodulin-binding protein	1.999	0.016	1.344	0.053
AT2G19900	ATNADP-ME1, NADP-ME1	1.126	0.015	0.084	0.861
AT2G20520	FLA6   FASCICLIN-like arabinogalactan 6	1.775	0.039	1.760	0.030
AT2G25000	WRKY60, ATWRKY60	1.402	0.007	0.213	0.605
AT2G29065	GRAS family transcription factor	1.180	0.006	0.143	0.670
AT2G29110	ATGLR2.8, GLR2.8	1.111	0.043	0.325	0.533
AT2G32840	proline-rich family protein	1.803	0.034	1.787	0.026
AT2G35980	YLS9, NHL10, ATNHL10	1.248	0.043	0.374	0.525
AT2G42850	CYP718   cytochrome P450, family 718	1.173	0.047	0.789	0.142
AT2G47270	UPB1	1.080	0.021	0.494	0.211
AT3G01345	Expressed protein	3.502	0.000	0.219	0.469
AT3G01970	WRKY45, ATWRKY45	1.484	0.032	0.128	0.871
AT3G06435	Expressed protein	1.347	0.020	0.087	0.891
AT3G09270	ATGSTU8, GSTU8	1.315	0.017	0.190	0.715
AT3G14075	Mono-/di-acylglycerol lipase, N-terminal;Lipase, class 3	1.522	0.013	0.026	0.969
AT3G23560	ALF5   MATE efflux family protein	1.135	0.007	0.224	0.485
AT3G25190	Vacuolar iron transporter (VIT) family protein	1.999	0.000	0.301	0.310
AT3G27940	LBD26   LOB domain-containing protein 26	1.100	0.008	0.119	0.740
AT3G28345	ABC transporter family protein	2.123	0.000	0.398	0.168
AT3G29639	unknown Protein	1.427	0.034	1.129	0.065
AT3G29780	RALFL27   ralfl-like 27	1.044	0.032	0.146	0.773
AT3G46340	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	1.317	0.006	0.676	0.051
AT3G49960	Peroxidase superfamily protein	1.309	0.013	1.343	0.006
AT3G50970	LTI30, XERO2	1.339	0.000	0.285	0.153
AT3G54580	Proline-rich extensin-like family protein	1.001	0.010	1.324	0.001
AT4G01870	tolB protein-related	1.225	0.006	0.958	0.007
AT4G02280	SUS3, ATSUS3	1.120	0.004	0.283	0.285
AT4G03723	unknown protein	1.024	0.014	0.283	0.405
AT4G07960	ATCSLC12, CSLC12	1.164	0.004	1.147	0.001
AT4G13180	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	1.435	0.007	0.582	0.134
AT4G13390	Proline-rich extensin-like family protein	1.090	0.035	1.093	0.026
AT4G25400	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	1.189	0.021	0.027	0.963

AT4G28040	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein	1.099	0.013	0.988	0.011
AT4G28850	XTH26, ATXTH26	1.563	0.005	1.581	0.001
AT4G34138	UGT73B1	1.543	0.016	0.187	0.761
AT5G03545	AT4, ATIPS2	1.330	0.032	0.318	0.583
AT5G06860	PGIP1, ATPGIP1	1.669	0.014	0.200	0.754
AT5G25260	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family	1.076	0.047	0.022	0.974
AT5G34940	AtGUS3, GUS3	1.307	0.021	0.182	0.743
AT5G57530	XTH12, AtXTH12	1.008	0.016	1.190	0.004
AT5G61820	unknown protein	1.898	0.000	0.703	0.027

**Tabelle 6.4: In der *sc14/33* Mutante durch SA-Behandlung induzierte Gene**

Angegeben sind der Induktionsfaktor in Col-0 und der *sc14/33* Mutante nach SA-Behandlung und der jeweils als log2-fache Induktion. Rot dargestellte Werte bedeuten eine Induktion, während grün dargestellte Werte eine Repression bedeuten. P-Werte über 0,05 sind gelb hinterlegt.

AGI-Code	Beschreibung	Col-0 Kontr. / Col-0 SA	adjusted P-Value	<i>sc14/33</i> Kontr. / <i>sc14/33</i> SA	adjusted P-Value
AT1G01720	ATAF1, ANAC002	1.074	0.014	1.342	0.008
AT1G02230	ANAC004, NAC004	2.340	0.001	3.165	0.000
AT1G02450	NIMIN1, NIMIN-1	1.002	0.104	2.442	0.003
AT1G03850	Glutaredoxin family protein	0.925	0.084	1.366	0.029
AT1G05560	UGT1, UGT75B1	1.787	0.008	2.209	0.004
AT1G06645	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	0.798	0.013	1.279	0.002
AT1G07590	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	1.299	0.000	1.008	0.003
AT1G15260	unknown protein	1.395	0.012	1.460	0.016
AT1G18265	Protein of unknown function, DUF593	1.922	0.002	1.683	0.007
AT1G18990	Protein of unknown function, DUF593	1.374	0.015	1.636	0.011
AT1G19540	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	1.946	0.003	2.092	0.004
AT1G21270	WAK2   wall-associated kinase 2	0.557	0.159	1.102	0.021
AT1G23450	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3.194	0.000	1.413	0.009
AT1G27970	NTF2B   nuclear transport factor 2B	0.757	0.077	1.053	0.035
AT1G28480	GRX480, roxy19	3.117	0.000	2.575	0.001
AT1G29510	SAUR68	0.191	0.522	1.289	0.001
AT1G30455	transcription regulators;translation initiation factors;zinc ion binding;transcription activators	1.957	0.002	2.577	0.001
AT1G30473	Heavy metal transport/detoxification superfamily	2.145	0.001	1.741	0.006

	protein				
AT1G33600	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0.006	0.992	1.014	0.036
AT1G48405	Kinase interacting (KIP1-like) family protein	1.432	0.000	1.359	0.001
AT1G48560	unknown protein	2.702	0.003	3.129	0.003
AT1G48830	Ribosomal protein S7e family protein	0.682	0.275	1.644	0.025
AT1G49160	WNK7	0.482	0.315	1.158	0.039
AT1G49750	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0.064	0.934	1.381	0.043
AT1G50190	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	1.177	0.001	1.033	0.004
AT1G52370	Ribosomal protein L22p/L17e family protein	1.112	0.012	1.034	0.028
AT1G59660	Nucleoporin autopeptidase	1.237	0.010	1.533	0.005
AT1G62880	Cornichon family protein	2.170	0.001	1.267	0.038
AT1G62886	Nucleotide excision repair, TFIIH, subunit TTDA	2.845	0.000	2.824	0.000
AT1G72930	TIR   toll/interleukin-1 receptor-like	0.048	0.937	1.192	0.027
AT1G74830	Protein of unknown function, DUF593	1.398	0.002	1.848	0.001
AT1G78995	unknown protein	2.993	0.000	2.806	0.001
AT1G80030	Molecular chaperone Hsp40/DnaJ family protein	0.911	0.020	1.269	0.006
AT1G80660	HA9   H(+)-ATPase 9	0.582	0.031	1.420	0.000
AT2G05720	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	3.312	0.000	3.019	0.001
AT2G11270	citrate synthase-related	1.139	0.000	1.169	0.001
AT2G21900	WRKY59, ATWRKY59	0.928	0.116	1.388	0.045
AT2G23170	GH3.3   Auxin-responsive GH3 family protein	1.201	0.003	1.360	0.003
AT2G25510	unknown protein	0.588	0.293	1.292	0.046
AT2G29420	ATGSTU7, GST25, GSTU7	4.089	0.000	2.116	0.000
AT2G32235	unknown protein	1.161	0.029	1.382	0.021
AT2G32340	TraB family protein	1.280	0.009	1.015	0.045
AT2G35640	Homeodomain-like superfamily protein	1.243	0.007	1.405	0.006
AT2G36800	DOGT1, UGT73C5	1.278	0.008	1.453	0.007
AT2G40750	WRKY54, ATWRKY54	1.233	0.009	1.378	0.008
AT2G40925	F-box and associated interaction domains-containing protein	2.406	0.000	2.113	0.000
AT2G41090	Calcium-binding EF-hand family protein	0.091	0.904	1.498	0.028
AT2G45150	cytidinediphosphate diacylglycerol synthase 4	1.349	0.012	1.368	0.019
AT3G06280	F-box associated ubiquitination effector family protein	1.371	0.001	1.324	0.003
AT3G07150	unknown protein	1.392	0.000	1.115	0.003
AT3G09240	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain	1.189	0.006	1.332	0.005
AT3G13062	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	0.817	0.086	1.391	0.015
AT3G14735	U6-1   U6-1; snRNA	1.089	0.008	1.074	0.014
AT3G16660	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0.082	0.917	1.397	0.045



AT3G20520	SVL3   SHV3-like 3	0.876	0.003	1.082	0.002
AT3G22231	PCC1   pathogen and circadian controlled 1	0.829	0.159	2.947	0.001
AT3G51910	AT-HSFA7A, HSFA7A	1.314	0.011	1.303	0.020
AT3G54280	CHR16, CHA16, RGD3, ATBTAF1, BTAF1	1.496	0.003	1.567	0.004
AT3G56400	WRKY70, ATWRKY70	0.991	0.029	2.017	0.001
AT3G56600	Protein kinase superfamily protein	0.631	0.063	1.282	0.004
AT3G56790	RNA splicing factor-related	1.404	0.006	1.763	0.003
AT3G60760	unknown protein	1.668	0.000	1.957	0.000
AT3G62320	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	0.752	0.070	1.163	0.018
AT3G62350	unknown protein	1.111	0.039	1.413	0.022
AT3G63320	Protein phosphatase 2C family protein	1.246	0.000	1.625	0.000
AT4G04730	unknown protein	1.208	0.015	1.050	0.048
AT4G10410	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	1.564	0.009	1.317	0.033
AT4G12400	Hop3   stress-inducible protein, putative	1.490	0.017	2.134	0.004
AT4G14368	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	1.424	0.011	1.323	0.025
AT4G15550	IAGLU   indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase	2.468	0.000	2.371	0.001
AT4G19080	Protein of unknown function (DUF594)	2.511	0.000	1.100	0.032
AT4G19095	unknown protein	2.088	0.000	1.024	0.035
AT4G19645	TRAM, LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein	2.079	0.003	1.509	0.024
AT4G19865	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	4.552	0.000	2.103	0.001
AT4G19870	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	4.140	0.001	2.101	0.042
AT4G25434	ATNUDT10, NUDT10   nudix hydrolase homolog 10	0.604	0.227	1.377	0.021
AT4G27652	unknown protein	1.818	0.000	1.181	0.005
AT4G29880	PIRL7	2.557	0.000	2.685	0.000
AT4G31196	oxidoreductases	1.098	0.009	1.224	0.008
AT4G31800	WRKY18	0.585	0.026	1.070	0.002
AT4G34131	UGT73B3	3.327	0.000	1.694	0.010
AT4G35180	LHT7   LYS/HIS transporter 7	0.583	0.091	1.537	0.001
AT4G38215	other RNA	1.683	0.000	1.165	0.001
AT4G38480	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	1.697	0.000	1.409	0.001
AT5G01900	WRKY62, ATWRKY62	1.919	0.001	1.848	0.003
AT5G03350	Legume lectin family protein	0.150	0.783	3.006	0.000
AT5G07100	WRKY26	0.162	0.774	1.251	0.025
AT5G07870	HXXXD-type acyl-transferase family protein	3.110	0.000	1.863	0.001
AT5G08790	ATAF2, anac081	2.156	0.000	1.471	0.006
AT5G14890	NHL domain-containing protein	1.364	0.000	1.166	0.000
AT5G20935	unknown protein	1.235	0.000	1.025	0.001
AT5G21920	YLMG2	0.806	0.094	1.202	0.034

AT5G22570	WRKY38, ATWRKY38	2.068	0.008	2.492	0.005
AT5G25450	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14kDa subunit	1.347	0.011	1.376	0.016
AT5G35688	unknown protein	3.174	0.000	1.590	0.015
AT5G44568	unknown protein	0.236	0.526	1.526	0.002
AT5G45110	NPR3, ATNPR3	1.449	0.003	1.147	0.021
AT5G48400	ATGLR1.2, GLR1.2	0.926	0.037	1.634	0.004
AT5G53470	ACBP1, ACBP	2.079	0.000	1.863	0.000
AT5G58120	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	1.084	0.011	1.043	0.021
AT5G59160	TOPP2, PPO	2.150	0.002	2.330	0.003
AT5G59820	RHL41, ZAT12	2.099	0.000	1.189	0.005
AT5G60380	Protein of Unknown Function (DUF239)	1.220	0.006	1.325	0.007
AT5G63790	ANAC102, NAC102	2.575	0.000	2.718	0.000
AT5G64240	AtMC3, MC3   metacaspase 3	2.426	0.003	1.503	0.049
AT5G64810	WRKY51, ATWRKY51	1.377	0.011	1.453	0.015
AT5G66110	HIPP27	1.294	0.003	1.170	0.010

**Tabelle 6.5: In Col-0 durch SA-Behandlung induzierte Gene**

Angegeben sind der Induktionsfaktor in Col-0 und der *sc14/33* Mutante nach SA-Behandlung und der jeweils als log2-fache Induktion. Rot dargestellte Werte bedeuten eine Induktion, während grün dargestellte Werte eine Repression bedeuten. P-Werte über 0,05 sind gelb hinterlegt.

AGI-Code	Beschreibung	Col-0 Kontr. / Col-0 SA	adjusted P-Value	<i>sc14/33</i> Kontr. / <i>sc14/33</i> SA	adjusted P-Value
AT1G01720	ATAF1, ANAC002	1.074	0.014	1.342	0.008
AT1G02230	ANAC004, NAC004	2.340	0.001	3.165	0.000
AT1G02880	TPK1   thiamin pyrophosphokinase1	1.432	0.031	0.531	0.525
AT1G04090	Plant protein of unknown function (DUF946)	1.019	0.002	0.810	0.011
AT1G05560	UGT1, UGT75B1   UDP-glucosyltransferase 75B1	1.787	0.008	2.209	0.004
AT1G05820	SPPL5, ATSPPL5   SIGNAL PEPTIDE PEPTIDASE-LIKE 5	1.021	0.007	0.816	0.035
AT1G06260	Cysteine proteinases superfamily protein	1.167	0.002	0.955	0.012
AT1G07590	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	1.299	0.000	1.008	0.003
AT1G09710	Homeodomain-like superfamily protein	1.788	0.022	0.545	0.579
AT1G10820	Protein of unknown function (DUF3755)	2.633	0.011	0.202	0.908
AT1G12770	ISE1, EMB1586	1.166	0.002	0.893	0.012
AT1G12775	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	1.015	0.024	0.961	0.049
AT1G15125	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	1.417	0.000	0.884	0.009
AT1G15260	unknown protein	1.395	0.012	1.460	0.016

AT1G17147	VQ motif-containing protein	1.679	0.000	0.496	0.049
AT1G17170	ATGSTU24, GST, GSTU24	1.240	0.002	0.475	0.202
AT1G18250	ATLP-1   Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	1.037	0.016	0.544	0.242
AT1G18265	Protein of unknown function, DUF593	1.922	0.002	1.683	0.007
AT1G18990	Protein of unknown function, DUF593	1.374	0.015	1.636	0.011
AT1G19115	unknown protein;	1.947	0.047	1.021	0.388
AT1G19540	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	1.946	0.003	2.092	0.004
AT1G20150	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	1.083	0.003	0.356	0.316
AT1G20925	Auxin efflux carrier family protein	1.100	0.002	0.957	0.007
AT1G21680	DPP6 N-terminal domain-like protein	1.309	0.000	0.394	0.147
AT1G23450	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3.194	0.000	1.413	0.009
AT1G23460	Pectin lyase-like superfamily protein	1.129	0.002	0.306	0.416
AT1G23465	Peptidase S24/S26A/S26B/S26C family protein	1.095	0.035	0.656	0.266
AT1G26800	RING/U-box superfamily protein	1.539	0.005	0.996	0.063
AT1G27921	other RNA	1.039	0.042	0.582	0.330
AT1G28480	GRX480, roxy19   Thioredoxin superfamily protein	3.117	0.000	2.575	0.001
AT1G30455	transcription regulators;translation initiation factors;zinc ion binding;transcription activators	1.957	0.002	2.577	0.001
AT1G30473	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	2.145	0.001	1.741	0.006
AT1G33030	O-methyltransferase family protein	1.005	0.007	0.919	0.019
AT1G48405	Kinase interacting (KIP1-like) family protein	1.432	0.000	1.359	0.001
AT1G48560	unknown protein	2.702	0.003	3.129	0.003
AT1G50190	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	1.177	0.001	1.033	0.004
AT1G52370	Ribosomal protein L22p/L17e family protein	1.112	0.012	1.034	0.028
AT1G54160	NFYA5, NF-YA5   nuclear factor Y, subunit A5	1.128	0.028	0.846	0.132
AT1G59660	Nucleoporin autopeptidase	1.237	0.010	1.533	0.005
AT1G62880	Cornichon family protein	2.170	0.001	1.267	0.038
AT1G62886	Nucleotide excision repair, TFIIH, subunit TTDA	2.845	0.000	2.824	0.000
AT1G63010	Major Facilitator Superfamily with SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	1.391	0.049	0.627	0.481
AT1G66080	unknown protein	1.000	0.006	0.555	0.120
AT1G69750	COX19-2, ATCOX19-2   cytochrome c oxidase 19-2	1.048	0.024	0.208	0.758
AT1G72416	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	1.062	0.008	0.629	0.124

AT1G72660	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	1.677	0.044	0.800	0.431
AT1G74310	ATHSP101, HSP101, HOT1	1.478	0.007	0.965	0.075
AT1G74830	Protein of unknown function, DUF593	1.398	0.002	1.848	0.001
AT1G75270	DHAR2   dehydroascorbate reductase 2	1.203	0.004	0.244	0.616
AT1G76600	unknown protein	2.216	0.001	0.476	0.500
AT1G76680	OPR1   12-oxophytodienoate reductase 1	1.937	0.001	0.926	0.084
AT1G76690	OPR2, ATOPR2   12-oxophytodienoate reductase 2	1.735	0.000	0.499	0.209
AT1G77450	anac032, NAC032	1.176	0.015	0.562	0.287
AT1G78995	unknown protein	2.993	0.000	2.806	0.001
AT1G79710	Major facilitator superfamily protein	1.733	0.000	0.148	0.696
AT1G79790	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	1.825	0.006	0.873	0.192
AT1G79820	SGB1   Major facilitator superfamily protein	1.090	0.002	0.318	0.369
AT2G01100	unknown protein	1.462	0.015	1.088	0.087
AT2G01200	IAA32   indole-3-acetic acid inducible 32	1.017	0.001	0.741	0.010
AT2G04440	MutT/nudix family protein	1.022	0.001	0.841	0.004
AT2G05720	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	3.312	0.000	3.019	0.001
AT2G11270	citrate synthase-related	1.139	0.000	1.169	0.001
AT2G14160	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	1.308	0.002	0.975	0.018
AT2G15490	UGT73B4   UDP-glycosyltransferase 73B4	1.477	0.023	1.206	0.085
AT2G19310	HSP20-like chaperones superfamily protein	1.264	0.002	0.167	0.747
AT2G23170	GH3.3   Auxin-responsive GH3 family protein	1.201	0.003	1.360	0.003
AT2G28210	ATACA2, ACA2   alpha carbonic anhydrase 2	1.037	0.026	0.277	0.652
AT2G29420	ATGSTU7, GST25, GSTU7   glutathione S-transferase tau 7	4.089	0.000	2.116	0.000
AT2G29480	ATGSTU2, GST20, GSTU2   glutathione S-transferase tau 2	1.320	0.013	0.508	0.404
AT2G29490	ATGSTU1, GST19, GSTU1   glutathione S-transferase TAU 1	1.192	0.002	0.283	0.447
AT2G31981	unknown protein	1.219	0.046	1.165	0.086
AT2G32235	unknown protein	1.161	0.029	1.382	0.021
AT2G32340	TraB family protein	1.280	0.009	1.015	0.045
AT2G33100	ATCSLD1, CSLD1   cellulose synthase-like D1	1.065	0.001	0.926	0.003
AT2G35640	Homeodomain-like superfamily protein	1.243	0.007	1.405	0.006
AT2G36355	Family of unknown function (DUF662)	1.648	0.008	0.784	0.219

AT2G36390	SBE2.1, BE3   starch branching enzyme 2.1	1.296	0.001	0.708	0.035
AT2G36800	DOGT1, UGT73C5   don-glucosyltransferase 1	1.278	0.008	1.453	0.007
AT2G38255	Protein of Unknown Function (DUF239)	1.685	0.011	1.219	0.076
AT2G40750	WRKY54, ATWRKY54	1.233	0.009	1.378	0.008
AT2G40925	F-box and associated interaction domains-containing protein	2.406	0.000	2.113	0.000
AT2G45150	cytidinediphosphate diacylglycerol synthase 4	1.349	0.012	1.368	0.019
AT2G46320	Mitochondrial substrate carrier family protein	1.527	0.034	0.366	0.719
AT2G47895	other RNA	3.225	0.000	0.730	0.116
AT2G48121	unknown protein	1.003	0.004	0.870	0.015
AT3G01510	LSF1   like SEX4 1	1.506	0.000	0.439	0.085
AT3G01513	unknown protein	1.970	0.000	0.313	0.471
AT3G04130	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3.352	0.000	0.583	0.211
AT3G04140	Ankyrin repeat family protein	2.102	0.000	0.162	0.807
AT3G06280	F-box associated ubiquitination effector family protein	1.371	0.001	1.324	0.003
AT3G06400	CHR11   chromatin-remodeling protein 11	2.890	0.028	0.574	0.767
AT3G07150	unknown protein	1.392	0.000	1.115	0.003
AT3G07740	ADA2A, ATADA2A, HAC10, HXA02, HXA2   homolog of yeast ADA2 2A	1.170	0.039	0.175	0.855
AT3G09240	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain	1.189	0.006	1.332	0.005
AT3G11560	LETM1-like protein	1.049	0.028	0.637	0.228
AT3G12580	HSP70, ATHSP70   heat shock protein 70	1.021	0.017	0.300	0.576
AT3G13030	hAT transposon superfamily protein	1.023	0.042	0.595	0.311
AT3G13065	SRF4   STRUBBELIG-receptor family 4	1.385	0.001	0.852	0.021
AT3G14660	CYP72A13	1.142	0.014	0.399	0.468
AT3G14735	U6-1   U6-1; snRNA	1.089	0.008	1.074	0.014
AT3G17340	ARM repeat superfamily protein	1.973	0.023	0.940	0.341
AT3G17660	AGD15   ARF-GAP domain 15	1.064	0.001	0.649	0.024
AT3G17670	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	1.183	0.036	0.352	0.642
AT3G19800	Protein of unknown function (DUF177)	1.303	0.001	0.990	0.008
AT3G24500	MBF1C, ATMBF1C   multiprotein bridging factor 1C	1.319	0.019	0.642	0.304
AT3G24560	RSY3   Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	1.288	0.001	0.755	0.026
AT3G28740	CYP81D1   Cytochrome P450 superfamily protein	1.945	0.026	0.238	0.872
AT3G45730	unknown protein	1.325	0.003	0.850	0.051
AT3G47090	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	1.153	0.004	0.753	0.053

AT3G51760	Protein of unknown function (DUF688)	1.500	0.008	0.792	0.171
AT3G51910	AT-HSFA7A, HSFA7A	1.314	0.011	1.303	0.020
AT3G54280	CHR16, CHA16, RGD3, ATBTAF1, BTAF1	1.496	0.003	1.567	0.004
AT3G56790	RNA splicing factor-related	1.404	0.006	1.763	0.003
AT3G56830	Protein of unknown function (DUF565)	1.078	0.041	0.647	0.287
AT3G56980	BHLH039, ORG3   basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	1.165	0.002	0.265	0.508
AT3G60176	other RNA	1.239	0.001	0.619	0.057
AT3G60760	unknown protein	1.668	0.000	1.957	0.000
AT3G62350	unknown protein	1.111	0.039	1.413	0.022
AT3G63320	Protein phosphatase 2C family protein	1.246	0.000	1.625	0.000
AT4G03510	RMA1, ATRMA1   RING membrane-anchor 1	1.218	0.009	0.512	0.303
AT4G04730	unknown protein	1.208	0.015	1.050	0.048
AT4G10410	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	1.564	0.009	1.317	0.033
AT4G12400	Hop3   stress-inducible protein, putative	1.490	0.017	2.134	0.004
AT4G14030	SBP1   selenium-binding protein 1	1.286	0.002	0.165	0.730
AT4G14040	EDA38, SBP2   selenium-binding protein 2	1.391	0.002	0.192	0.725
AT4G14368	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	1.424	0.011	1.323	0.025
AT4G15550	IAGLU   indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase	2.468	0.000	2.371	0.001
AT4G17590	unknown protein	2.898	0.028	0.275	0.905
AT4G19060	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	1.390	0.004	0.861	0.067
AT4G19070	Putative membrane lipoprotein	1.110	0.002	0.643	0.055
AT4G19080	Protein of unknown function (DUF594)	2.511	0.000	1.100	0.032
AT4G19095	unknown protein	2.088	0.000	1.024	0.035
AT4G19110	Protein kinase superfamily protein	3.041	0.036	1.201	0.513
AT4G19645	TRAM, LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein	2.079	0.003	1.509	0.024
AT4G19865	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	4.552	0.000	2.103	0.001
AT4G19870	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	4.140	0.001	2.101	0.042
AT4G19880	Glutathione S-transferase family protein	1.710	0.038	0.226	0.874
AT4G21990	APR3, PRH-26, PRH26, ATAPR3   APS reductase 3	1.177	0.014	0.187	0.792
AT4G24460	CLT2   CRT (chloroquine-resistance transporter)-like transporter 2	1.687	0.028	0.656	0.485

AT4G25450	ATNAP8, NAP8   non-intrinsic ABC protein 8	2.329	0.014	0.225	0.886
AT4G27652	unknown protein	1.818	0.000	1.181	0.005
AT4G27654	unknown protein	1.441	0.002	0.564	0.202
AT4G27657	unknown protein	1.193	0.002	0.447	0.198
AT4G28790	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	1.237	0.025	0.195	0.821
AT4G29850	Eukaryotic protein of unknown function (DUF872)	2.165	0.038	0.151	0.939
AT4G29880	PIRL7   plant intracellular ras group-related LRR 7	2.557	0.000	2.685	0.000
AT4G31196	oxidoreductases	1.098	0.009	1.224	0.008
AT4G32630	ArfGap/RecO-like zinc finger domain-containing protein	1.157	0.003	0.959	0.013
AT4G33650	ADL2, DRP3A   dynamin-related protein 3A	2.005	0.003	0.720	0.284
AT4G34131	UGT73B3   UDP-glucosyl transferase 73B3	3.327	0.000	1.694	0.010
AT4G34135	UGT73B2   UDP-glucosyltransferase 73B2	1.770	0.012	0.150	0.897
AT4G36040	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	1.283	0.005	0.240	0.659
AT4G36052	other RNA	1.382	0.008	0.109	0.897
AT4G38215	other RNA	1.683	0.000	1.165	0.001
AT4G38480	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	1.697	0.000	1.409	0.001
AT4G38490	unknown protein	1.215	0.000	0.944	0.003
AT5G01900	WRKY62, ATWRKY62	1.919	0.001	1.848	0.003
AT5G05410	DREB2A, DREB2   DRE-binding protein 2A	2.144	0.028	0.449	0.752
AT5G06820	SRF2   STRUBBELIG-receptor family 2	1.086	0.009	0.990	0.023
AT5G07860	HXXXD-type acyl-transferase family protein	1.964	0.001	0.909	0.061
AT5G07870	HXXXD-type acyl-transferase family protein	3.110	0.000	1.863	0.001
AT5G07880	SNAP29, ATSNAP29   synaptosomal-associated protein SNAP25-like 29	1.293	0.001	0.673	0.043
AT5G07900	Mitochondrial transcription termination factor family protein	1.404	0.011	0.199	0.806
AT5G08790	ATAF2, anac081	2.156	0.000	1.471	0.006
AT5G12280	SWAP (Suppressor-of-White-A-Pricot)/surp RNA-binding domain-containing protein	1.349	0.023	0.785	0.225
AT5G13080	WRKY75, ATWRKY75	1.008	0.049	0.396	0.553
AT5G14270	ATBET9, BET9	2.927	0.012	1.816	0.138
AT5G14470	GHMP kinase family protein	2.286	0.007	0.368	0.739
AT5G14730	unknown protein	2.216	0.000	0.640	0.176
AT5G14890	NHL domain-containing protein	1.364	0.000	1.166	0.000
AT5G16300	Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein	1.472	0.005	0.467	0.396

AT5G18400	Cytokine-induced anti-apoptosis inhibitor 1, Fe-S biogenesis	1.333	0.046	0.484	0.582
AT5G20935	unknown protein	1.235	0.000	1.025	0.001
AT5G22570	WRKY38, ATWRKY38	2.068	0.008	2.492	0.005
AT5G25450	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14kDa subunit	1.347	0.011	1.376	0.016
AT5G26980	SYP41, ATSYP41, ATTLG2A	1.366	0.021	0.341	0.661
AT5G27010	ARM repeat superfamily protein	1.103	0.003	0.964	0.013
AT5G27030	TPR3   TOPLESS-related 3	2.470	0.048	2.145	0.127
AT5G35688	unknown protein	3.174	0.000	1.590	0.015
AT5G42965	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	1.023	0.010	0.841	0.041
AT5G45110	NPR3, ATNPR3	1.449	0.003	1.147	0.021
AT5G51440	HSP20-like chaperones superfamily protein	1.116	0.016	0.024	0.979
AT5G52100	crr1   Dihydrodipicolinate reductase, bacterial/plant	1.505	0.012	1.150	0.067
AT5G53470	ACBP1, ACBP   acyl-CoA binding protein 1	2.079	0.000	1.863	0.000
AT5G57010	calmodulin-binding family protein	1.124	0.016	0.003	0.998
AT5G58120	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	1.084	0.011	1.043	0.021
AT5G59160	TOPP2, PPO	2.150	0.002	2.330	0.003
AT5G59820	RHL41, ZAT12   C2H2-type zinc finger family protein	2.099	0.000	1.189	0.005
AT5G60380	Protein of Unknown Function (DUF239)	1.220	0.006	1.325	0.007
AT5G60410	ATSIZ1, SIZ1	1.445	0.044	0.662	0.459
AT5G60440	AGL62	1.165	0.026	0.830	0.145
AT5G61495	unknown protein	1.765	0.000	0.967	0.011
AT5G61800	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	1.192	0.025	0.059	0.953
AT5G63790	ANAC102, NAC102	2.575	0.000	2.718	0.000
AT5G64150	RNA methyltransferase family protein	1.008	0.023	0.634	0.188
AT5G64240	AtMC3, MC3   metacaspase 3	2.426	0.003	1.503	0.049
AT5G64250	Aldolase-type TIM barrel family protein	1.330	0.002	0.673	0.077
AT5G64810	WRKY51, ATWRKY51	1.377	0.011	1.453	0.015
AT5G66045	MIR170   MIR170; miRNA	1.637	0.035	1.264	0.142
AT5G66110	HIPP27	1.294	0.003	1.170	0.010
AT5G66985	unknown protein	1.296	0.007	0.168	0.806



**Tabelle 6.6: Liste der 516 SA-beeinflussten Gene aus der MarVis Analyse**

Normalized Profile gibt die Relative Expression der einzelnen Gene unter den angegebenen Bedingungen an. PrototypeProfile gibt die durchschnittliche Relative Expression der Gene in einem Prototyp an. Die Cluster Number entspricht der Nummer des Prototyps, in den die Gene eingeordnet wurden.

AGI-Code	Beschreibung	NormalizedProfile				Cluster Number	PrototypeProfile			
		Col-0 SA	Col-0 Kontr.	<i>scl14/33</i> SA	<i>scl14/33</i> Kontr.		Col-0 SA	Col-0 Kontr.	<i>scl14/33</i> SA	<i>scl14/33</i> Kontr.
AT1G13360.1	unknown protein	0,727	0,369	0,506	0,283	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G18879.1	MIR837A MIR837a; miRNA	0,675	0,346	0,599	0,258	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G45545.1	Plant protein of unknown function (DUF827)	0,695	0,326	0,529	0,363	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G48267.1	MIR161 MIR161; miRNA	0,701	0,345	0,518	0,347	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G56700.2	Peptidase C15 pyroglutamyl peptidase I-like	0,708	0,311	0,542	0,329	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G63930.1	ROH1 from the Czech 'roh' meaning 'corner'	0,720	0,356	0,504	0,316	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G65570.1	Pectin lyase-like superfamily protein	0,694	0,346	0,520	0,358	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G70460.1	RHS10 root hair specific 10	0,743	0,331	0,506	0,288	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT2G22850.1	AtbZIP6 bZIP6 basic leucine-zipper 6	0,656	0,473	0,535	0,245	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT2G23290.1	AtMYB70 MYB70 myb domain protein 70	0,688	0,321	0,537	0,368	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT2G37820.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	0,680	0,333	0,561	0,335	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT2G46685.1	MIR166A MIR166 MIR166/MIR166A; miRNA	0,694	0,302	0,543	0,363	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT3G08710.1	ATH9 TRX H9 TH9 thioredoxin H-type 9	0,655	0,411	0,574	0,272	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT3G16857.1	ARR1 RR1 response regulator 1	0,674	0,356	0,593	0,260	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT3G18773.1	RING/U-box superfamily protein	0,718	0,294	0,568	0,275	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT3G23870.1	Protein of unknown function (DUF803)	0,719	0,354	0,504	0,321	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT4G31408.1	other RNA	0,721	0,307	0,539	0,309	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT4G32440.1	Plant Tudor-like RNA-binding protein	0,654	0,418	0,586	0,233	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT4G35030.2	Protein kinase superfamily protein	0,719	0,329	0,545	0,280	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT4G37890.1	EDA40 Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0,699	0,325	0,554	0,313	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT4G38810.1	Calcium-binding EF-hand family protein	0,727	0,402	0,532	0,166	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT4G39780.1	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	0,726	0,347	0,529	0,272	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT5G10990.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	0,674	0,322	0,596	0,296	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT5G16510.1	Alpha-14-glucan-protein synthase family protein	0,693	0,336	0,573	0,281	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT5G41680.1	Protein kinase superfamily protein	0,625	0,462	0,575	0,257	1	0,695	0,358	0,545	0,291

AT5G46845.1	MIR160C MIR160 MIR160/MIR160C (MICRORNA160); miRNA	0,676	0,501	0,498	0,212	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT5G60680.1	Protein of unknown function DUF584	0,710	0,338	0,562	0,259	1	0,695	0,358	0,545	0,291
AT1G12040.1	LRX1 leucine-rich repeat/extensin 1	0,808	0,240	0,479	0,245	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G12650.1	unknown protein	0,732	0,240	0,558	0,307	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G15240.1	Phox-associated domain;Phox- like;Sorting nexin C- terminal	0,775	0,237	0,531	0,248	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G28330.3	DYL1 dormancy- associated protein- like 1	0,758	0,322	0,503	0,262	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G48930.1	AtGH9C1 GH9C1 glycosyl hydrolase 9C1	0,787	0,234	0,513	0,250	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G63600.1	Receptor-like protein kinase-related family protein	0,799	0,243	0,470	0,284	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G66173.1	other RNA	0,749	0,237	0,580	0,215	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G74960.1	FAB1 KAS2 ATKAS2 fatty acid biosynthesis 1	0,769	0,276	0,486	0,310	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G75180.2	Erythronate-4- phosphate dehydrogenase family protein	0,725	0,241	0,564	0,312	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT2G21270.2	UFD1 ubiquitin fusion degradation 1	0,799	0,196	0,517	0,235	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT2G47275.1	MIR403 MIR403; miRNA	0,776	0,286	0,520	0,216	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT3G06330.2	RING/U-box superfamily protein	0,748	0,297	0,530	0,266	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT3G07070.1	Protein kinase superfamily protein	0,786	0,270	0,466	0,303	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT3G18240.1	Ribosomal protein S24/S35 mitochondrial	0,759	0,217	0,506	0,348	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT4G00355.3	unknown protein	0,769	0,258	0,536	0,235	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT5G19560.1	ATROPGEF10 ROPGEF10 ROP uanine nucleotide exchange factor 10	0,719	0,278	0,559	0,304	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT5G20300.2	Avirulence induced gene (AIG1) family protein	0,733	0,260	0,562	0,282	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT5G45410.2	unknown protein	0,800	0,220	0,498	0,251	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT5G48657.1	defense protein- related	0,760	0,236	0,557	0,236	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT5G61350.1	Protein kinase superfamily protein	0,740	0,287	0,537	0,284	2	0,765	0,254	0,524	0,270
AT1G01560.1	ATMPK11 MPK11 MAP kinase 11	0,767	0,357	0,361	0,393	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT1G05990.1	RHS1 EF hand calcium-binding protein family	0,734	0,350	0,443	0,377	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT1G19900.1	glyoxal oxidase- related protein	0,738	0,370	0,430	0,365	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT1G59850.1	ARM repeat superfamily protein	0,718	0,330	0,500	0,354	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT2G03720.1	MRH6 Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	0,757	0,312	0,487	0,305	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT2G18350.1	AtHB24 HB24 ZHD6 homeobox protein 24	0,747	0,365	0,428	0,355	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT3G10710.1	RHS12 root hair specific 12	0,777	0,342	0,433	0,303	3	0,750	0,335	0,453	0,341

AT3G20850.1	proline-rich family protein	0,758	0,353	0,440	0,327	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT4G20840.1	FAD-binding Berberine family protein	0,755	0,336	0,490	0,276	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT4G29180.2	RHS16 root hair specific 16	0,724	0,344	0,477	0,360	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT4G30320.1	CAP (Cysteine-rich secretory proteins Antigen 5 and Pathogenesis-related 1 protein) superfamily protein	0,742	0,332	0,490	0,315	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G04960.1	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily	0,765	0,332	0,475	0,280	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G06630.1	proline-rich extensin-like family protein	0,733	0,358	0,464	0,345	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G22410.1	RHS18 root hair specific 18	0,734	0,335	0,465	0,364	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G23870.2	Pectinacetylerase family protein	0,755	0,287	0,393	0,439	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G26080.1	proline-rich family protein	0,770	0,358	0,426	0,313	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G35190.1	proline-rich extensin-like family protein	0,747	0,336	0,481	0,313	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G38700.1	unknown protein	0,771	0,337	0,418	0,341	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G40580.1	PBB2 20S proteasome beta subunit PBB2	0,740	0,289	0,506	0,338	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G51270.1	U-box domain-containing protein kinase family protein	0,750	0,363	0,419	0,360	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G54940.1	Translation initiation factor SU11 family protein	0,738	0,302	0,495	0,346	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT5G57540.1	XTH13 AtXTH13 xyloglucan endotransglucosylase /hydrolase 13	0,781	0,284	0,446	0,332	3	0,750	0,335	0,453	0,341
AT1G31930.1	XLG3 extra-large GTP-binding protein 3	0,838	0,237	0,409	0,272	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT1G36050.1	Endoplasmic reticulum vesicle transporter protein	0,828	0,180	0,414	0,333	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT3G49960.1	Peroxidase superfamily protein	0,834	0,331	0,330	0,292	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT3G54580.1	Proline-rich extensin-like family protein	0,812	0,323	0,402	0,274	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT4G07960.1	ATCSLC12 CSLC12 Cellulose-synthase-like C12	0,800	0,361	0,354	0,322	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT4G13390.1	Proline-rich extensin-like family protein	0,811	0,373	0,370	0,258	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT4G25220.1	RHS15 root hair specific 15	0,789	0,318	0,432	0,299	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT5G19800.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	0,792	0,327	0,431	0,283	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT5G57530.1	XTH12 AtXTH12 xyloglucan endotransglucosylase /hydrolase 12	0,798	0,346	0,391	0,302	4	0,811	0,311	0,393	0,293
AT1G54970.1	ATPRP1 RHS7 PRP1 proline-rich protein 1	0,921	0,192	0,271	0,203	5	0,898	0,238	0,272	0,239
AT2G20520.1	FLA6 FASCICLIN-like arabinogalactan 6	0,912	0,252	0,247	0,208	5	0,898	0,238	0,272	0,239
AT2G32840.1	proline-rich family	0,925	0,248	0,249	0,147	5	0,898	0,238	0,272	0,239

	protein									
AT3G53420.1	PIP2A PIP2 PIP2;1 plasma membrane intrinsic protein 2A	0,884	0,242	0,308	0,257	5	0,898	0,238	0,272	0,239
AT4G28850.1	XTH26 ATXTH26 xyloglucan endotransglucosylase /hydrolase 26	0,870	0,292	0,291	0,270	5	0,898	0,238	0,272	0,239
AT5G30495.1	Fcf2 pre-rRNA processing protein	0,875	0,202	0,267	0,349	5	0,898	0,238	0,272	0,239
AT2G28800.2	ALB3 63 kDa inner membrane family protein	0,846	0,206	0,449	0,199	6	0,872	0,154	0,434	0,142
AT4G05050.2	UBQ11 ubiquitin 11	0,888	0,051	0,434	0,141	6	0,872	0,154	0,434	0,142
AT4G27410.1	RD26 NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein	0,906	0,073	0,408	0,079	6	0,872	0,154	0,434	0,142
AT5G11870.1	Alkaline phytoceramidase (aPHC)	0,872	0,212	0,422	0,127	6	0,872	0,154	0,434	0,142
AT5G41700.3	UBC8 ATUBC8 ubiquitin conjugating enzyme 8	0,845	0,227	0,455	0,165	6	0,872	0,154	0,434	0,142
AT1G13360.2	unknown protein	0,795	0,172	0,570	0,116	7	0,791	0,175	0,569	0,128
AT2G02390.2	ATGSTZ1 GST18 GSTZ1 glutathione S-transferase zeta 1	0,767	0,166	0,599	0,159	7	0,791	0,175	0,569	0,128
AT3G62400.1	unknown protein	0,808	0,105	0,559	0,151	7	0,791	0,175	0,569	0,128
AT5G03240.2	UBQ3 polyubiquitin 3	0,792	0,256	0,548	0,086	7	0,791	0,175	0,569	0,128
AT1G61660.2	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,728	0,119	0,664	0,119	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT1G66240.2	ATX1 ATATX1 homolog of anti-oxidant 1	0,750	0,085	0,640	0,144	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT2G32700.3	LUH LEUNIG_homolog	0,713	0,054	0,693	0,095	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT2G41430.4	ERD15 LSR1 CID1 dehydration-induced protein (ERD15)	0,764	0,078	0,631	0,113	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT3G01316.1	snoRNA	0,692	0,047	0,705	0,146	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT3G02470.1	SAMDC S-adenosylmethionine decarboxylase	0,796	0,044	0,598	0,085	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT4G29160.2	SNF7.1 SNF7 family protein	0,738	0,074	0,665	0,092	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT5G45775.1	Ribosomal L5P family protein	0,702	0,062	0,696	0,139	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT5G53160.1	RCAR3 PYL8 regulatory components of ABA receptor 3	0,779	0,040	0,622	0,073	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT5G55970.1	RING/U-box superfamily protein	0,791	0,062	0,600	0,104	8	0,745	0,067	0,651	0,111
AT1G10670.3	ACLA-1 ATP-citrate lyase A-1	0,752	0,106	0,609	0,231	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT1G26235.1	other RNA	0,723	0,098	0,665	0,163	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT1G27760.2	SAT32 ATSAT32	0,683	0,225	0,666	0,200	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT1G54730.1	Major facilitator superfamily protein	0,728	0,128	0,632	0,233	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT2G41430.3	ERD15 LSR1 CID1 dehydration-induced protein (ERD15)	0,708	0,063	0,678	0,189	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT2G41600.1	Mitochondrial glycoprotein family protein	0,712	0,181	0,658	0,166	9	0,716	0,145	0,654	0,184

AT3G60410.2	Protein of unknown function (DUF1639)	0,698	0,119	0,678	0,195	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT4G20320.1	CTP synthase family protein	0,717	0,096	0,666	0,181	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT4G33050.2	EDA39 calmodulin-binding family protein	0,699	0,147	0,683	0,153	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT5G14420.1	RGLG2 RING domain ligase2	0,715	0,178	0,652	0,179	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT5G20570.2	ROC1 RBX1 HRT1 ATRBX1 RING-box 1	0,742	0,165	0,605	0,234	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT5G57340.2	unknown protein	0,731	0,184	0,630	0,185	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT5G59613.1	unknown protein	0,725	0,153	0,656	0,146	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT5G65210.2	TGA1 bZIP transcription factor family protein	0,683	0,157	0,699	0,139	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT5G65210.4	TGA1 bZIP transcription factor family protein	0,729	0,177	0,639	0,173	9	0,716	0,145	0,654	0,184
AT1G26233.1	SNOR95 SNOR95; snoRNA	0,652	0,178	0,682	0,281	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT2G30520.2	RPT2 Phototropic-responsive NPH3 family protein	0,636	0,064	0,684	0,351	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT2G42130.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	0,713	0,127	0,599	0,341	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT3G61898.1	unknown protein	0,621	0,149	0,699	0,321	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT5G12240.1	unknown protein	0,677	0,108	0,673	0,278	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT5G14930.1	SAG101 senescence-associated gene 101	0,665	0,191	0,644	0,325	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT5G62760.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0,646	0,207	0,672	0,297	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT5G66564.1	snoRNA	0,667	0,205	0,662	0,274	10	0,660	0,153	0,664	0,308
AT1G01183.1	MIR165A MIR165 MIR165/MIR165A; miRNA	0,633	0,170	0,731	0,191	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT1G16840.2	unknown protein	0,608	0,160	0,755	0,186	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT1G56010.1	NAC1 anac021 NAC domain containing protein 1	0,673	0,211	0,678	0,206	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT1G69510.2	cAMP-regulated phosphoprotein 19-related protein	0,597	0,201	0,739	0,240	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT1G72360.1	HRE1 Integrase-type DNA-binding superfamily protein	0,624	0,187	0,733	0,195	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT2G04880.1	ZAP1 ATWRKY1 WRKY1 zinc-dependent activator protein-1	0,600	0,167	0,740	0,254	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT2G10606.1	MIR396A MIR396A; miRNA	0,645	0,136	0,723	0,209	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT2G45070.2	SEC61 BETA Preprotein translocase Sec Sec61-beta subunit protein	0,649	0,201	0,704	0,207	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT2G45960.2	PIP1B TMP-A ATHH2 PIP1;2 plasma membrane intrinsic protein 1B	0,616	0,218	0,744	0,142	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT3G02832.1	unknown	0,600	0,220	0,724	0,260	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT3G05410.1	Photosystem II reaction center PsbP family protein	0,636	0,184	0,702	0,262	11	0,624	0,183	0,727	0,212

AT3G61850.2	DAG1 Dof-type zinc finger DNA-binding family protein	0,586	0,140	0,759	0,246	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT4G24290.1	MAC/Perforin domain-containing protein	0,629	0,174	0,723	0,228	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT5G10450.3	GRF6 G-box regulating factor 6	0,588	0,216	0,748	0,218	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT5G47820.1	FRA1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0,594	0,188	0,762	0,174	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT5G51300.2	splicing factor-related	0,639	0,132	0,724	0,225	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT5G57150.3	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,675	0,245	0,674	0,175	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT5G61920.1	unknown protein	0,640	0,142	0,730	0,191	11	0,624	0,183	0,727	0,212
AT1G01100.1	60S acidic ribosomal protein family	0,586	0,180	0,773	0,163	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT1G53543.1	unknown protein	0,580	0,111	0,781	0,204	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT2G15390.1	FUT4 atfut4 fucosyltransferase 4	0,608	0,092	0,785	0,077	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT3G24614.1	snoRNA	0,577	0,119	0,786	0,189	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT3G55880.1	SUE4 Alpha/beta hydrolase related protein	0,663	0,109	0,731	0,123	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT5G48000.4	CYP708A2 THAH THAH1 cytochrome P450 family 708 subfamily A polypeptide 2	0,563	0,146	0,805	0,116	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT5G55550.3	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	0,596	0,140	0,775	0,158	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT5G62890.1	Xanthine/uracil permease family protein	0,568	0,113	0,790	0,202	12	0,596	0,121	0,777	0,149
ATMG01340.1	TRNM.2 tRNA-Met	0,628	0,084	0,766	0,111	12	0,596	0,121	0,777	0,149
AT1G16635.1	unknown	0,474	0,131	0,852	0,182	13	0,504	0,121	0,835	0,171
AT1G78206.1	MIR775A MIR775a; miRNA	0,551	0,056	0,818	0,156	13	0,504	0,121	0,835	0,171
AT3G58193.1	snoRNA	0,499	0,088	0,843	0,178	13	0,504	0,121	0,835	0,171
AT3G59970.1	MTHFR1 methylenetetrahydrofolate reductase 1	0,481	0,114	0,864	0,092	13	0,504	0,121	0,835	0,171
AT5G57150.2	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,498	0,158	0,830	0,194	13	0,504	0,121	0,835	0,171
ATMG00190.1	TRNG tRNA-Gly	0,519	0,179	0,805	0,224	13	0,504	0,121	0,835	0,171
AT1G55500.1	ECT4 evolutionarily conserved C-terminal region 4	0,378	0,118	0,897	0,196	14	0,419	0,149	0,864	0,220
AT3G16450.1	Mannose-binding lectin superfamily protein	0,394	0,139	0,877	0,236	14	0,419	0,149	0,864	0,220
AT4G10000.1	Thioredoxin family protein	0,469	0,247	0,834	0,156	14	0,419	0,149	0,864	0,220
AT4G36690.2	ATU2AF65A U2 snRNP auxiliary factor large subunit splicing factor	0,407	0,082	0,879	0,233	14	0,419	0,149	0,864	0,220
AT5G44286.1	snoRNA	0,447	0,160	0,835	0,278	14	0,419	0,149	0,864	0,220
AT2G28760.1	UXS6 UDP-XYL synthase 6	0,319	0,390	0,829	0,243	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT3G13060.1	ECT5 evolutionarily conserved C-terminal region 5	0,355	0,336	0,820	0,297	15	0,363	0,276	0,835	0,295

AT3G41762.1	unknown protein.	0,419	0,219	0,832	0,292	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT4G03292.1	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H-like superfamily protein	0,398	0,228	0,830	0,319	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT4G20440.2	smB small nuclear ribonucleoprotein associated protein B	0,341	0,250	0,876	0,231	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT5G47980.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,362	0,274	0,822	0,343	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT5G56030.1	HSP81-2 ERD8 HSP90.2 AtHsp90.2 heat shock protein 81-2	0,306	0,272	0,829	0,380	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT5G61310.2	Cytochrome c oxidase subunit Vc family protein	0,408	0,235	0,844	0,258	15	0,363	0,276	0,835	0,295
AT1G15002.1	Potential natural antisense gene locus overlaps with AT1G15000	0,471	0,203	0,791	0,333	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT1G19376.1	snoRNA	0,479	0,259	0,759	0,358	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT1G70410.1	ATBCA4 BCA4 CA4 beta carbonic anhydrase 4	0,484	0,264	0,749	0,369	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT2G35658.2	unknown protein	0,473	0,364	0,727	0,340	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT2G39681.1	TAS2 TAS2; other RNA	0,516	0,265	0,737	0,347	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT2G43137.1	snoRNA	0,499	0,231	0,770	0,325	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT3G06700.2	Ribosomal L29e protein family	0,460	0,384	0,740	0,306	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT5G52471.1	U60.1F U60.1F; snoRNA	0,464	0,272	0,789	0,296	16	0,484	0,276	0,759	0,329
ATMG00250.1	TRNM.1 tRNA-Met	0,514	0,239	0,771	0,291	16	0,484	0,276	0,759	0,329
AT1G03746.1	snoRNA	0,551	0,234	0,737	0,312	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT1G45474.1	LHCA5 photosystem I light harvesting complex gene 5	0,554	0,161	0,709	0,405	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT1G65960.1	GAD2 glutamate decarboxylase 2	0,576	0,212	0,698	0,369	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT1G75166.1	snoRNA	0,611	0,215	0,704	0,292	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT1G77930.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0,574	0,189	0,721	0,339	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT2G20722.1	snoRNA	0,543	0,213	0,772	0,254	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT2G31110.1	TBL40 Plant protein of unknown function (DUF828)	0,558	0,181	0,713	0,383	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT2G41100.3	TCH3 ATCAL4 Calcium-binding EF hand family protein	0,571	0,190	0,705	0,375	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT3G41761.1	other RNA	0,518	0,167	0,741	0,393	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT3G63110.1	ATIPT3 IPT3 isopentenyltransferase 3	0,533	0,242	0,736	0,340	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT4G20980.2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7 (eIF-3)	0,520	0,177	0,781	0,295	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT5G06265.2	hyaluronan mediated motility receptor-related	0,575	0,241	0,719	0,307	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT5G15022.1	Potential natural antisense gene locus overlaps with AT5G15030	0,612	0,242	0,701	0,275	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT5G28850.1	Calcium-binding EF-hand family protein	0,568	0,248	0,728	0,292	17	0,566	0,209	0,724	0,327

AT5G60300.1	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,603	0,214	0,714	0,285	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT5G65860.1	ankyrin repeat family protein	0,596	0,220	0,702	0,322	17	0,566	0,209	0,724	0,327
AT1G08920.2	ESL1 ERD (early response to dehydration) six-like 1	0,564	0,346	0,669	0,338	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT1G20070.1	unknown protein	0,587	0,337	0,673	0,299	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT1G73770.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match: Ribosomal protein S24/S35 mitochondrial (TAIR:AT3G18240.2)	0,575	0,313	0,678	0,334	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT1G75295.2	other RNA	0,518	0,357	0,710	0,316	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT2G24755.1	other RNA	0,576	0,278	0,671	0,375	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT2G39175.1	MIR160A MIR160 FOC MIR160/MIR160A; miRNA	0,548	0,356	0,682	0,329	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT2G46192.1	other RNA	0,580	0,272	0,683	0,350	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT3G50340.1	unknown protein	0,549	0,309	0,711	0,312	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT3G50825.1	snoRNA	0,572	0,282	0,694	0,334	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT4G17788.1	MIR160B MIR160 MIR160/MIR160B; miRNA	0,519	0,398	0,699	0,288	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT4G18975.3	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	0,533	0,324	0,705	0,337	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT4G26365.1	snoRNA	0,601	0,277	0,692	0,288	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT5G28020.1	CYSD2 ATCYSD2 cysteine synthase D2	0,597	0,258	0,674	0,350	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT5G50120.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	0,575	0,323	0,679	0,322	18	0,565	0,317	0,686	0,326
ATMG00350.1	TRNP Mitochondrial-encoded proline-accepting tRNA.	0,585	0,324	0,675	0,312	18	0,565	0,317	0,686	0,326
AT1G05710.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,606	0,324	0,665	0,291	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT1G15920.1	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H-like superfamily protein	0,675	0,245	0,657	0,231	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT1G28310.1	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein	0,603	0,343	0,655	0,301	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT1G69760.1	unknown protein	0,619	0,305	0,658	0,302	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT1G77235.1	MIR402 MIR402; miRNA	0,639	0,254	0,685	0,242	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT1G78080.1	RAP2.4 related to AP2 4	0,637	0,322	0,632	0,302	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT2G03810.1	18S pre-ribosomal assembly protein gar2-related	0,650	0,310	0,678	0,148	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT2G09795.2	other RNA	0,662	0,313	0,628	0,264	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT2G25250.1	unknown protein	0,623	0,357	0,626	0,304	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT3G21710.1	unknown protein	0,630	0,330	0,661	0,240	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT3G27270.1	TRAM LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein	0,650	0,369	0,616	0,250	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT3G28690.1	Protein kinase superfamily protein	0,666	0,326	0,631	0,227	19	0,634	0,321	0,651	0,259



AT3G43790.2	ZIFL2 zinc induced facilitator-like 2	0,587	0,397	0,654	0,264	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT3G47810.2	MAG1 Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein	0,695	0,262	0,627	0,235	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT3G53570.1	AFC1 AME2 FC1 FUS3-complementing gene 1	0,596	0,435	0,603	0,302	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT3G56410.1	Protein of unknown function (DUF3133)	0,647	0,296	0,650	0,267	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT4G02005.1	other RNA	0,646	0,265	0,684	0,212	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT4G36090.1	oxidoreductase 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	0,657	0,267	0,668	0,226	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT5G11090.1	serine-rich protein-related	0,646	0,342	0,614	0,298	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT5G18780.1	F-box/RNI-like superfamily protein	0,584	0,376	0,665	0,276	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT5G26600.1	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	0,589	0,311	0,703	0,249	19	0,634	0,321	0,651	0,259
AT1G15930.1	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gad45 family protein	0,680	0,234	0,627	0,298	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT1G48490.2	Protein kinase superfamily protein	0,683	0,289	0,575	0,346	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT1G73390.1	Endosomal targeting BRO1-like domain-containing protein	0,644	0,284	0,614	0,357	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT2G30120.1	unknown protein	0,654	0,247	0,638	0,324	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT3G28140.2	RNA ligase/cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein	0,652	0,295	0,630	0,302	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT3G49010.1	ATBBC1 BBC1 RSU2 breast basic conserved 1	0,682	0,297	0,583	0,326	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT3G50760.1	GATL2 galacturonosyltransferase-like 2	0,622	0,269	0,644	0,355	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT3G62680.1	PRP3 ATPRP3 proline-rich protein 3	0,670	0,212	0,631	0,328	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT4G02890.3	UBQ14 Ubiquitin family protein	0,701	0,283	0,562	0,335	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT4G05000.1	VPS28-2 Vacuolar protein sorting-associated protein VPS28 family protein	0,666	0,212	0,625	0,347	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT4G40030.3	Histone superfamily protein	0,694	0,268	0,609	0,276	20	0,668	0,263	0,613	0,327
AT1G27370.1	SPL10 squamosa promoter binding protein-like 10	0,632	0,302	0,592	0,399	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT1G31070.1	GlcNAc1pUT1 N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase 1	0,614	0,296	0,572	0,456	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT1G50055.1	TAS1B TAS1B; other RNA	0,586	0,268	0,656	0,393	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT1G65010.1	Plant protein of unknown function (DUF827)	0,596	0,287	0,631	0,405	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT2G39675.1	TAS1C TAS1C; other RNA	0,608	0,252	0,636	0,403	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT3G02180.2	SP1L3 SPIRAL1-like3	0,656	0,316	0,566	0,387	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT3G12560.1	TRFL9 ATTBP2 TRF-like 9	0,632	0,299	0,610	0,372	21	0,611	0,286	0,614	0,407

AT3G22790.1	Kinase interacting (KIP1-like) family protein	0,563	0,268	0,648	0,438	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT3G56860.2	UBA2A UBP1-associated protein 2A	0,594	0,295	0,617	0,422	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT3G60330.2	HA7 H(+)-ATPase 7	0,636	0,291	0,600	0,389	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT4G35920.2	MCA1 PLAC8 family protein	0,607	0,280	0,628	0,399	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT5G06165.1	unknown	0,593	0,272	0,659	0,374	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT5G35732.1	unknown protein	0,634	0,302	0,579	0,415	21	0,611	0,286	0,614	0,407
ATMG00380.1	TRNN tRNA-Asn	0,600	0,277	0,606	0,443	21	0,611	0,286	0,614	0,407
AT1G29890.1	O-acetyltransferase family protein	0,741	0,194	0,478	0,431	22	0,671	0,271	0,521	0,446
AT1G63400.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	0,666	0,326	0,518	0,426	22	0,671	0,271	0,521	0,446
AT1G66783.1	MIR157A MIR157A; miRNA	0,681	0,340	0,514	0,395	22	0,671	0,271	0,521	0,446
AT2G23450.1	Protein kinase superfamily protein	0,691	0,248	0,495	0,465	22	0,671	0,271	0,521	0,446
AT3G14840.1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	0,666	0,300	0,503	0,462	22	0,671	0,271	0,521	0,446
AT5G41760.1	Nucleotide-sugar transporter family protein	0,643	0,234	0,574	0,450	22	0,671	0,271	0,521	0,446
ATCG01140.1	TRNN.2 tRNA-Asn	0,611	0,256	0,565	0,492	22	0,671	0,271	0,521	0,446
AT2G16200.1	structural molecules	0,606	0,284	0,389	0,633	23	0,654	0,266	0,378	0,596
AT5G43310.1	COP1-interacting protein-related	0,701	0,247	0,368	0,559	23	0,654	0,266	0,378	0,596
ATCG00030.1	TRNK TRNK-UUU TRNA LYS Lysine tRNA	0,455	0,226	0,560	0,655	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG00240.1	TRNY tRNA-Tyr	0,455	0,084	0,591	0,661	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG00250.1	TRNE this chloroplast gene encodes a UUC tRNA whose expression is regulated by SIG2.	0,481	0,127	0,588	0,638	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG00400.1	TRNL.1 tRNA-Leu	0,549	0,181	0,608	0,544	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG00410.1	TRNF chloroplast TRNF	0,480	0,208	0,552	0,649	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG00440.1	NDHC NADH:ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase chain 3 protein	0,436	0,185	0,579	0,664	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG00450.1	TRNV.1 tRNA-Val	0,523	0,168	0,639	0,539	24	0,481	0,173	0,582	0,628
ATCG01150.1	TRNR.3 tRNA-Arg	0,469	0,203	0,537	0,672	24	0,481	0,173	0,582	0,628
AT1G21270.1	WAK2 wall-associated kinase 2	0,247	0,361	0,378	0,816	26	0,288	0,320	0,356	0,828
AT1G29510.1	SAUR68 SAUR-like auxin-responsive protein family	0,295	0,333	0,338	0,830	26	0,288	0,320	0,356	0,828
AT1G33600.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0,317	0,318	0,387	0,805	26	0,288	0,320	0,356	0,828
AT3G16660.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,303	0,277	0,313	0,857	26	0,288	0,320	0,356	0,828
AT5G07100.1	WRKY26 WRKY DNA-binding protein 26	0,278	0,309	0,366	0,832	26	0,288	0,320	0,356	0,828
AT1G49750.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0,141	0,130	0,336	0,922	27	0,211	0,216	0,313	0,896

AT2G41090.1	Calcium-binding EF-hand family protein	0,248	0,230	0,301	0,891	27	0,211	0,216	0,313	0,896
AT5G44568.1	unknown protein	0,245	0,289	0,300	0,875	27	0,211	0,216	0,313	0,896
AT3G22231.1	PCC1 pathogen and circadian controlled 1	0,132	0,242	0,119	0,954	28	0,112	0,242	0,134	0,951
AT5G03350.1	Legume lectin family protein	0,131	0,146	0,118	0,974	28	0,112	0,242	0,134	0,951
AT5G22570.1	WRKY38 ATWRKY38 WRKY DNA-binding protein 38	0,074	0,337	0,164	0,924	28	0,112	0,242	0,134	0,951
AT1G02230.1	ANAC004 NAC004	0,097	0,490	0,096	0,861	29	0,123	0,453	0,173	0,861
AT1G02450.1	NIMIN1 NIMIN-1 NIM1-interacting 1	0,200	0,396	0,162	0,882	29	0,123	0,453	0,173	0,861
AT5G01900.1	WRKY62 ATWRKY62 WRKY DNA-binding protein 62	0,107	0,412	0,243	0,871	29	0,123	0,453	0,173	0,861
AT5G27030.1	TPR3 TOPLESS-related 3	0,089	0,514	0,190	0,832	29	0,123	0,453	0,173	0,861
AT1G15260.1	unknown protein	0,195	0,510	0,285	0,788	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT1G48830.1	Ribosomal protein S7e family protein	0,283	0,442	0,260	0,811	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT1G80660.2	HA9 H(+)-ATPase 9	0,285	0,430	0,301	0,802	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT2G21900.1	WRKY59 ATWRKY59 WRKY DNA-binding protein 59	0,243	0,445	0,307	0,805	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT2G25510.2	unknown protein	0,268	0,400	0,325	0,814	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT2G40750.1	WRKY54 ATWRKY54 WRKY DNA-binding protein 54	0,188	0,449	0,314	0,815	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT3G56400.1	WRKY70 ATWRKY70 WRKY DNA-binding protein 70	0,238	0,472	0,202	0,825	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT4G12400.1	Hop3 stress-inducible protein putative	0,200	0,538	0,187	0,797	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT4G35180.1	LHT7 LYS/HIS transporter 7	0,289	0,430	0,276	0,810	30	0,243	0,457	0,273	0,807
AT1G03850.1	Glutaredoxin family protein	0,297	0,554	0,291	0,722	31	0,326	0,503	0,312	0,734
AT1G72930.2	TIR toll/interleukin-1 receptor-like	0,409	0,430	0,311	0,742	31	0,326	0,503	0,312	0,734
AT3G62320.1	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H-like superfamily protein	0,312	0,530	0,321	0,721	31	0,326	0,503	0,312	0,734
AT4G25434.2	ATNUDT10 NUDT10 nudix hydrolase homolog 10	0,339	0,510	0,284	0,737	31	0,326	0,503	0,312	0,734
AT4G31800.2	WRKY18 WRKY DNA-binding protein 18	0,298	0,447	0,359	0,763	31	0,326	0,503	0,312	0,734
AT5G21920.2	YLMG2 YGGT family protein	0,302	0,546	0,307	0,719	31	0,326	0,503	0,312	0,734
AT1G59660.1	Nucleoporin autopeptidase	0,238	0,575	0,257	0,740	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT1G74310.1	ATHSP101 HSP101 HOT1 heat shock protein 101	0,197	0,537	0,362	0,736	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT1G80030.2	Molecular chaperone Hsp40/DnaJ family protein	0,310	0,586	0,289	0,691	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT2G45150.2	cytidinediphosphate diacylglycerol synthase 4	0,235	0,576	0,288	0,728	32	0,235	0,577	0,286	0,724

AT3G19800.2	Protein of unknown function (DUF177)	0,219	0,534	0,367	0,730	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT3G60760.1	unknown protein	0,185	0,582	0,197	0,767	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT3G63320.1	Protein phosphatase 2C family protein	0,256	0,603	0,234	0,719	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT4G31196.1	oxidoreductases	0,275	0,568	0,306	0,713	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT5G25450.1	Cytochrome bd ubiquinol oxidase 14kDa subunit	0,240	0,613	0,263	0,705	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT5G52100.1	crr1 Dihydrodipicolinate reductase bacterial/plant	0,195	0,565	0,327	0,732	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT5G64810.1	WRKY51 ATWRKY51 WRKY DNA-binding protein 51	0,240	0,610	0,260	0,709	32	0,235	0,577	0,286	0,724
AT1G12770.1	ISE1 EMB1586	0,275	0,624	0,345	0,645	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT1G15125.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	0,222	0,592	0,371	0,680	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT1G18250.2	ATLP-1 Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	0,266	0,563	0,443	0,644	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT3G24500.1	MBF1C ATMBF1C multiprotein bridging factor 1C	0,252	0,624	0,398	0,624	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT3G24500.2	MBF1C multiprotein bridging factor 1C	0,285	0,582	0,370	0,666	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT3G60176.1	other RNA	0,243	0,574	0,426	0,656	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT4G12400.2	Hop3 stress-inducible protein putative	0,277	0,598	0,408	0,632	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT4G24460.1	CLT2 CRT (chloroquine-resistance transporter)-like transporter 2	0,201	0,635	0,381	0,642	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT4G33650.1	ADL2 DRP3A dynamin-related protein 3A	0,161	0,636	0,399	0,640	33	0,243	0,603	0,393	0,648
AT1G69750.1	COX19-2 ATCOX19-2 cytochrome c oxidase 19-2	0,268	0,563	0,505	0,597	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT1G79820.3	SGB1 Major facilitator superfamily protein	0,272	0,571	0,482	0,606	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT2G46320.2	Mitochondrial substrate carrier family protein	0,186	0,547	0,505	0,641	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT3G07740.2	ADA2A ATADA2A HAC10 HXA02 HXA2 homolog of yeast ADA2 2A	0,278	0,586	0,571	0,503	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT3G12580.1	HSP70 ATHSP70 heat shock protein 70	0,274	0,548	0,492	0,619	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT4G17590.1	unknown protein	0,103	0,608	0,572	0,541	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT4G25450.2	ATNAP8 NAP8 non-intrinsic ABC protein 8	0,118	0,549	0,606	0,563	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT5G18400.2	Cytokine-induced anti-apoptosis inhibitor 1 Fe-S biogenesis	0,244	0,631	0,606	0,417	34	0,220	0,569	0,545	0,565
AT5G51440.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	0,237	0,518	0,564	0,598	34	0,220	0,569	0,545	0,565

AT1G20150.1	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	0,313	0,663	0,419	0,535	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT1G23465.1	Peptidase S24/S26A/S26B/S26 C family protein	0,334	0,679	0,349	0,553	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT1G27921.1	other RNA	0,305	0,612	0,406	0,607	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT1G66080.1	unknown protein	0,312	0,620	0,408	0,593	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT2G28210.1	ATACA2 ACA2 alpha carbonic anhydrase 2	0,324	0,691	0,410	0,500	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT2G36355.3	Family of unknown function (DUF662)	0,295	0,638	0,464	0,538	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT3G11560.2	LETM1-like protein	0,317	0,636	0,376	0,595	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT3G13030.2	hAT transposon superfamily protein	0,303	0,642	0,391	0,587	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT3G17660.1	AGD15 ARF-GAP domain 15	0,317	0,663	0,365	0,571	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT3G17670.1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	0,279	0,604	0,464	0,585	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT3G47090.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,294	0,648	0,360	0,603	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT3G56830.2	Protein of unknown function (DUF565)	0,303	0,630	0,385	0,603	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT4G21990.1	APR3 PRH-26 PRH26 ATAPR3 APS reductase 3	0,296	0,675	0,445	0,509	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT4G21990.2	APR3 APS reductase 3	0,288	0,659	0,427	0,548	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT5G64150.1	RNA methyltransferase family protein	0,327	0,649	0,371	0,578	35	0,307	0,647	0,403	0,567
AT1G09710.1	Homeodomain-like superfamily protein	0,218	0,722	0,366	0,545	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT1G63010.1	Major Facilitator Superfamily with SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein	0,247	0,699	0,359	0,567	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT1G72416.4	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0,334	0,694	0,347	0,536	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT1G72660.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0,268	0,740	0,299	0,540	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT1G79790.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	0,216	0,749	0,307	0,546	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT2G36355.2	Family of unknown function (DUF662)	0,232	0,700	0,338	0,584	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT2G36390.1	SBE2.1 BE3 starch branching enzyme 2.1	0,291	0,718	0,330	0,539	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT3G06400.1	CHR11 chromatin-remodeling protein 11	0,143	0,716	0,387	0,563	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT3G13065.1	SRF4 STRUBBELIG-receptor family 4	0,262	0,691	0,326	0,589	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT3G24560.3	RSY3 Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	0,278	0,674	0,348	0,589	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT4G19060.1	P-loop containing nucleoside triphosphate	0,273	0,736	0,299	0,543	36	0,262	0,712	0,337	0,554

	hydrolases superfamily protein									
AT4G19070.1	Putative membrane lipoprotein	0,318	0,700	0,344	0,538	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT5G12280.1	SWAP (Suppressor- of-White- APricot)/surp RNA- binding domain- containing protein	0,272	0,732	0,312	0,541	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT5G26980.1	SYP41 ATSY41 ATTLG2A syntaxin of plants 41	0,258	0,715	0,399	0,513	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT5G60410.3	ATSIZ1 SIZ1	0,285	0,722	0,341	0,530	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT5G60440.1	AGL62 AGAMOUS- like 62	0,300	0,704	0,315	0,561	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT5G61495.1	unknown protein	0,210	0,723	0,300	0,586	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT5G64240.2	AtMC3 MC3 metacaspase 3	0,307	0,688	0,352	0,556	36	0,262	0,712	0,337	0,554
AT1G04090.1	Plant protein of unknown function (DUF946)	0,331	0,670	0,328	0,578	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G05820.2	SPPL5 ATSPPL5 SIGNAL PEPTIDE PEPTIDASE-LIKE 5	0,311	0,639	0,346	0,613	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G06645.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	0,362	0,632	0,264	0,633	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G12775.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	0,344	0,676	0,298	0,580	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G27970.1	NTF2B nuclear transport factor 2B	0,350	0,599	0,320	0,645	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G49160.1	WNK7 Protein kinase superfamily protein	0,431	0,594	0,281	0,619	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G52370.1	Ribosomal protein L22p/L17e family protein	0,304	0,642	0,311	0,631	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT1G54160.1	NFYA5 NF-YA5 nuclear factor Y subunit A5	0,293	0,647	0,348	0,612	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT2G01200.2	IAA32 indole-3- acetic acid inducible 32	0,313	0,631	0,364	0,609	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT2G04440.1	MutT/nudix family protein	0,318	0,646	0,340	0,605	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT2G33100.1	ATCSLD1 CSLD1 cellulose synthase- like D1	0,303	0,634	0,331	0,630	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT2G48121.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match: Ribonuclease III family protein (TAIR:AT4G37510.1).	0,328	0,655	0,325	0,598	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT3G13062.2	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	0,349	0,595	0,258	0,676	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT3G20520.1	SVL3 SHV3-like 3	0,353	0,648	0,290	0,609	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT3G56600.2	Protein kinase superfamily protein	0,386	0,597	0,266	0,651	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT5G27010.1	ARM repeat superfamily protein	0,308	0,655	0,317	0,613	37	0,335	0,635	0,314	0,619
AT5G42965.1	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H-like superfamily protein	0,308	0,630	0,346	0,623	37	0,335	0,635	0,314	0,619

AT1G06260.1	Cysteine proteinases superfamily protein	0,311	0,703	0,293	0,569	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT1G07590.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,277	0,681	0,301	0,608	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT1G20925.1	Auxin efflux carrier family protein	0,317	0,685	0,301	0,583	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT1G48405.1	Kinase interacting (KIP1-like) family protein	0,269	0,726	0,230	0,590	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT2G11270.1	citrate synthase-related	0,309	0,679	0,270	0,609	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT2G14160.1	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	0,266	0,650	0,322	0,634	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT2G31981.1	unknown protein	0,272	0,673	0,278	0,629	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT2G32340.1	TraB family protein	0,271	0,676	0,307	0,612	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT2G38255.1	Protein of Unknown Function (DUF239)	0,220	0,701	0,278	0,619	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT3G06280.1	F-box associated ubiquitination effector family protein	0,274	0,717	0,238	0,595	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT3G07150.1	unknown protein	0,269	0,701	0,277	0,600	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT4G04730.1	unknown protein	0,302	0,677	0,293	0,605	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT4G32630.2	ArfGap/RecO-like zinc finger domain-containing protein	0,310	0,688	0,301	0,583	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT4G38490.1	unknown protein	0,288	0,669	0,316	0,608	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT5G06820.1	SRF2 STRUBBELIG-receptor family 2	0,325	0,688	0,296	0,577	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT5G14890.1	NHL domain-containing protein	0,271	0,699	0,270	0,605	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT5G20935.1	unknown protein	0,282	0,664	0,306	0,621	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT5G60380.1	Protein of Unknown Function (DUF239)	0,291	0,685	0,247	0,620	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT5G66110.1	HIPP27 Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	0,284	0,698	0,266	0,601	38	0,285	0,687	0,284	0,604
AT1G18990.1	Protein of unknown function DUF593	0,274	0,686	0,202	0,643	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT1G74830.1	Protein of unknown function DUF593	0,256	0,678	0,185	0,664	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT2G23170.1	GH3.3 Auxin-responsive GH3 family protein	0,277	0,629	0,265	0,677	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT2G32235.1	unknown protein	0,292	0,652	0,258	0,651	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT2G35640.1	Homeodomain-like superfamily protein	0,297	0,676	0,238	0,630	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT2G36800.1	DOG1 UGT73C5 don-glucosyltransferase 1	0,263	0,630	0,255	0,684	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT3G09240.1	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain	0,281	0,647	0,262	0,659	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT3G51910.1	AT-HSFA7A HSF7A heat shock transcription factor A7A	0,259	0,636	0,273	0,674	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT3G54280.1	CHR16 CHA16 RGD3 ATBTAF1 BTAF1	0,237	0,679	0,226	0,657	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT3G56790.1	RNA splicing factor-related	0,237	0,633	0,210	0,707	39	0,261	0,660	0,246	0,658

AT3G62350.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match: F-box family protein (TAIR:AT1G71320.1)	0,306	0,657	0,251	0,642	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT4G38215.1	other RNA	0,214	0,683	0,285	0,637	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT4G38480.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	0,218	0,702	0,238	0,635	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT5G45110.1	NPR3 ATNPR3 NPR1-like protein 3	0,242	0,652	0,299	0,654	39	0,261	0,660	0,246	0,658
AT1G05560.1	UGT1 UGT75B1 UDP-glucosyltransferase 75B1	0,196	0,722	0,141	0,648	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT1G30455.1	transcription regulators;translation initiation factors;zinc ion binding;transcription activators	0,186	0,678	0,117	0,701	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT1G48560.1	unknown protein	0,099	0,658	0,085	0,742	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT1G62886.1	Nucleotide excision repair TFIIH subunit TDA	0,105	0,753	0,092	0,643	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT1G78995.1	unknown protein	0,097	0,731	0,095	0,669	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT2G05720.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	0,079	0,770	0,082	0,628	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT2G40925.1	F-box and associated interaction domains-containing protein	0,138	0,733	0,149	0,649	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT4G29880.1	PIRL7 plant intracellular ras group-related LRR 7	0,128	0,756	0,098	0,634	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT5G53470.1	ACBP1 ACBP acyl-CoA binding protein 1	0,166	0,704	0,182	0,666	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT5G59160.1	TOPP2 PPO type one serine/threonine protein phosphatase 2	0,159	0,683	0,146	0,698	40	0,135	0,719	0,119	0,668
AT1G18265.1	Protein of unknown function DUF593	0,194	0,739	0,192	0,616	41	0,169	0,759	0,172	0,603
AT1G19540.1	NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	0,191	0,751	0,142	0,616	41	0,169	0,759	0,172	0,603
AT1G30473.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	0,172	0,748	0,185	0,614	41	0,169	0,759	0,172	0,603
AT5G14270.1	ATBET9 BET9 bromodomain and extraterminal domain protein 9	0,119	0,799	0,170	0,565	41	0,169	0,759	0,172	0,603
AT1G26800.1	RING/U-box superfamily protein	0,264	0,758	0,266	0,534	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT1G33030.1	O-methyltransferase family protein	0,375	0,751	0,253	0,481	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT1G50190.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	0,317	0,720	0,271	0,555	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT2G01100.1	unknown protein	0,273	0,755	0,241	0,545	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT3G14735.1	U6-1 U6-1; snRNA	0,346	0,725	0,256	0,537	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT3G45730.1	unknown protein	0,300	0,764	0,278	0,499	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT3G51760.1	Protein of unknown function (DUF688)	0,270	0,795	0,272	0,470	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT4G10410.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0,270	0,818	0,191	0,470	42	0,295	0,759	0,251	0,519



AT4G14368.1	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein	0,287	0,769	0,210	0,532	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT4G27652.1	unknown protein	0,217	0,760	0,248	0,560	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT5G07880.1	SNAP29 ATSNAP29 synaptosomal-associated protein SNAP25-like 29	0,306	0,748	0,312	0,499	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT5G58120.1	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	0,350	0,711	0,267	0,549	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT5G66045.1	MIR170 MIR170; miRNA	0,257	0,792	0,201	0,517	42	0,295	0,759	0,251	0,519
AT1G10820.1	Protein of unknown function (DUF3755)	0,144	0,860	0,312	0,378	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT1G19115.1	unknown protein	0,214	0,843	0,193	0,453	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT1G62880.2	Cornichon family protein	0,184	0,826	0,212	0,489	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT3G01513.1	unknown protein	0,224	0,866	0,278	0,349	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT3G17340.1	ARM repeat superfamily protein	0,238	0,844	0,220	0,427	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT4G19080.1	Protein of unknown function (DUF594)	0,151	0,882	0,190	0,403	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT5G07860.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,212	0,844	0,231	0,436	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT5G64240.1	AtMC3 MC3 metacaspase 3	0,155	0,856	0,162	0,466	43	0,190	0,853	0,225	0,425
AT1G02880.1	TPK1 thiamin pyrophosphokinase1	0,286	0,748	0,354	0,483	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT1G23460.1	Pectin lyase-like superfamily protein	0,351	0,779	0,326	0,403	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT2G19310.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	0,322	0,772	0,361	0,413	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT3G01510.1	LSF1 like SEX4 1	0,278	0,787	0,327	0,443	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT4G03510.1	RMA1 ATRMA1 RING membrane-anchor 1	0,331	0,763	0,321	0,452	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT4G14040.1	EDA38 SBP2 selenium-binding protein 2	0,290	0,767	0,377	0,431	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT4G27654.1	unknown protein	0,295	0,819	0,274	0,409	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT4G27657.1	unknown protein	0,345	0,787	0,304	0,411	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT4G28790.2	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,306	0,721	0,412	0,467	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT4G29850.1	Eukaryotic protein of unknown function (DUF872)	0,209	0,772	0,399	0,448	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT5G07900.1	Mitochondrial transcription termination factor family protein	0,289	0,816	0,329	0,378	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT5G16300.2	Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein	0,288	0,797	0,429	0,313	44	0,299	0,777	0,351	0,421
AT1G01720.1	ATAF1 ANAC002	0,388	0,817	0,156	0,396	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT1G75270.1	DHAR2 dehydroascorbate reductase 2	0,363	0,847	0,297	0,250	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT3G14660.1	CYP72A13 cytochrome P450 family 72 subfamily A polypeptide 13	0,394	0,841	0,224	0,295	45	0,365	0,827	0,260	0,329

AT3G56980.1	BHLH039 ORG3 basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,357	0,809	0,298	0,359	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT4G14030.1	SBP1 selenium-binding protein 1	0,339	0,832	0,326	0,293	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT4G19880.3	Glutathione S-transferase family protein	0,372	0,830	0,216	0,355	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT4G36040.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0,343	0,831	0,284	0,333	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT4G36052.1	other RNA	0,316	0,850	0,288	0,308	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT5G13080.1	WRKY75 ATWRKY75 WRKY DNA-binding protein 75	0,411	0,823	0,235	0,314	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT5G48400.1	ATGLR1.2 GLR1.2 Glutamate receptor family protein	0,405	0,795	0,137	0,431	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT5G57010.1	calmodulin-binding family protein	0,376	0,804	0,323	0,328	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT5G61800.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	0,344	0,819	0,328	0,320	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT5G66985.1	unknown protein	0,339	0,854	0,262	0,295	45	0,365	0,827	0,260	0,329
AT1G17170.1	ATGSTU24 GST GSTU24 glutathione S-transferase TAU 24	0,369	0,881	0,175	0,240	46	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G21680.1	DPP6 N-terminal domain-like protein	0,360	0,890	0,170	0,224	46	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G77450.1	anac032 NAC032 NAC domain containing protein 32	0,392	0,871	0,166	0,245	46	0,367	0,883	0,168	0,237
AT2G29480.1	ATGSTU2 GST20 GSTU2 glutathione S-transferase tau 2	0,345	0,896	0,160	0,231	46	0,367	0,883	0,168	0,237
AT2G29490.1	ATGSTU1 GST19 GSTU1 glutathione S-transferase TAU 1	0,389	0,890	0,151	0,184	46	0,367	0,883	0,168	0,237
AT5G64250.2	Aldolase-type TIM barrel family protein	0,344	0,870	0,187	0,298	46	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G17147.1	VQ motif-containing protein	0,283	0,907	0,181	0,254	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT1G76600.1	unknown protein	0,195	0,957	0,128	0,175	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT1G79710.1	Major facilitator superfamily protein	0,271	0,901	0,229	0,252	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT3G04140.1	Ankyrin repeat family protein	0,216	0,928	0,202	0,226	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT3G28740.1	CYP81D1 Cytochrome P450 superfamily protein	0,204	0,961	0,120	0,142	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT4G19880.2	Glutathione S-transferase family protein	0,274	0,942	0,128	0,149	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT4G34135.1	UGT73B2 UDP-glucosyltransferase 73B2	0,249	0,926	0,214	0,187	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT5G05410.1	DREB2A DREB2 DRE-binding protein 2A	0,200	0,927	0,183	0,259	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT5G14470.1	GHMP kinase family protein	0,173	0,953	0,153	0,196	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT5G14730.1	unknown protein	0,197	0,928	0,171	0,266	47	0,226	0,933	0,171	0,211
AT1G76680.2	OPR1 12-oxophytodienoate reductase 1	0,234	0,906	0,165	0,312	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT1G76690.1	OPR2 ATOPR2 12-oxophytodienoate reductase 2	0,263	0,895	0,207	0,294	48	0,229	0,899	0,160	0,333

AT2G15490.3	UGT73B4 UDP-glycosyltransferase 73B4	0,298	0,882	0,146	0,335	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT4G19095.1	unknown protein	0,206	0,896	0,176	0,352	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT4G19645.2	TRAM LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein	0,198	0,899	0,129	0,369	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT5G05410.2	DREB2A DREB2 DRE-binding protein 2A	0,222	0,909	0,183	0,302	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT5G08790.1	ATAF2 anac081	0,199	0,910	0,122	0,342	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT5G59820.1	RHL41 ZAT12 C2H2-type zinc finger family protein	0,211	0,898	0,155	0,354	48	0,229	0,899	0,160	0,333
AT1G23450.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,100	0,950	0,104	0,277	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT1G28480.1	GRX480 roxy19 Thioredoxin superfamily protein	0,099	0,895	0,072	0,429	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT4G15550.1	IAGLU indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase	0,169	0,927	0,064	0,329	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT4G19110.3	Protein kinase superfamily protein	0,130	0,945	0,137	0,266	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT5G07870.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,103	0,909	0,107	0,388	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT5G35688.1	unknown protein	0,101	0,947	0,100	0,289	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT5G63790.1	ANAC102 NAC102 NAC domain containing protein 102	0,156	0,935	0,048	0,316	49	0,123	0,930	0,090	0,328
AT2G29420.1	ATGSTU7 GST25 GSTU7 glutathione S-transferase tau 7	0,058	0,990	0,029	0,125	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT2G47895.1	other RNA	0,100	0,971	0,112	0,184	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT3G04130.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,093	0,985	0,082	0,123	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19865.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	0,040	0,980	0,044	0,188	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19870.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	0,059	0,982	0,042	0,172	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19870.2	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	0,037	0,974	0,059	0,217	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G34131.1	UGT73B3 UDP-glucosyl transferase 73B3	0,093	0,989	0,033	0,108	50	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G34135.2	UGT73B2 UDP-glucosyltransferase 73B2	0,138	0,986	0,049	0,077	50	0,077	0,982	0,056	0,149

**Tabelle 6.7: Liste der 620 in den Genotypen Col-0 und *sc14/33* unterschiedlich exprimierten Gene aus der MarVis Analyse**

Normalized Profile gibt die Relative Expression der einzelnen Gene unter den angegebenen Bedingungen an. PrototypeProfile gibt die durchschnittliche Relative Expression der Gene in einem Prototyp an. Die Cluster Number entspricht der Nummer des Prototyps, in den die Gene eingeordnet wurden.

AGI-Code	Beschreibung	NormalizedProfile				Cluster Number	PrototypeProfile			
		Col-0 SA	Col-0 Kontr.	<i>sc14/33</i> SA	<i>sc14/33</i> Kontr.		Col-0 SA	Col-0 Kontr.	<i>sc14/33</i> SA	<i>sc14/33</i> Kontr.
AT4G34135.2	UGT73B2 UDP-glucosyltransferase 73B2	0,138	0,986	0,049	0,077	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G34131.1	UGT73B3 UDP-glucosyltransferase 73B3	0,093	0,989	0,033	0,108	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT2G29420.1	ATGSTU7 GST25 GSTU7 glutathione S-transferase tau 7	0,058	0,990	0,029	0,125	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT3G04130.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,093	0,985	0,082	0,123	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19870.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	0,059	0,982	0,042	0,172	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19865.1	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	0,040	0,980	0,044	0,188	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT2G47895.1	other RNA	0,100	0,971	0,112	0,184	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19870.2	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein	0,037	0,974	0,059	0,217	1	0,077	0,982	0,056	0,149
AT4G19880.2	Glutathione S-transferase family protein	0,274	0,942	0,128	0,149	2	0,211	0,953	0,132	0,165
AT3G28740.1	CYP81D1 Cytochrome P450 superfamily protein	0,204	0,961	0,120	0,142	2	0,211	0,953	0,132	0,165
AT1G76600.1	unknown protein	0,195	0,957	0,128	0,175	2	0,211	0,953	0,132	0,165
AT5G14470.1	GHMP kinase family protein	0,173	0,953	0,153	0,196	2	0,211	0,953	0,132	0,165
AT1G23450.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,100	0,950	0,104	0,277	3	0,126	0,934	0,084	0,320
AT5G35688.1	unknown protein	0,101	0,947	0,100	0,289	3	0,126	0,934	0,084	0,320
AT5G63790.1	ANAC102 NAC102 NAC domain containing protein 102	0,156	0,935	0,048	0,316	3	0,126	0,934	0,084	0,320
AT4G15550.1	IAGLU indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase	0,169	0,927	0,064	0,329	3	0,126	0,934	0,084	0,320
AT5G07870.1	HXXXD-type acyltransferase family protein	0,103	0,909	0,107	0,388	3	0,126	0,934	0,084	0,320
AT5G05410.2	DREB2A DREB2 DRE-binding protein 2A	0,222	0,909	0,183	0,302	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT1G76680.2	OPR1 12-oxophytodienoate reductase 1	0,234	0,906	0,165	0,312	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT5G08790.1	ATAF2 anac081	0,199	0,910	0,122	0,342	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT5G59820.1	RHL41 ZAT12 C2H2-type zinc finger family protein	0,211	0,898	0,155	0,354	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT4G19095.1	unknown protein	0,206	0,896	0,176	0,352	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT2G15490.3	UGT73B4 UDP-glucosyltransferase 73B4	0,298	0,882	0,146	0,335	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT4G19645.2	TRAM LAG1 and CLN8 (TLC) lipid-sensing domain containing protein	0,198	0,899	0,129	0,369	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT4G19080.1	Protein of unknown function (DUF594)	0,151	0,882	0,190	0,403	4	0,215	0,898	0,158	0,346
AT4G34135.1	UGT73B2 UDP-glucosyltransferase 73B2	0,249	0,926	0,214	0,187	5	0,243	0,907	0,212	0,261
AT3G04140.1	Ankyrin repeat family protein	0,216	0,928	0,202	0,226	5	0,243	0,907	0,212	0,261
AT1G79710.1	Major facilitator superfamily protein	0,271	0,901	0,229	0,252	5	0,243	0,907	0,212	0,261

AT1G17147.1	VQ motif-containing protein	0,283	0,907	0,181	0,254	5	0,243	0,907	0,212	0,261
AT5G14730.1	unknown protein	0,197	0,928	0,171	0,266	5	0,243	0,907	0,212	0,261
AT1G76690.1	OPR2 ATOPR2 12-oxophytodienoate reductase 2	0,263	0,895	0,207	0,294	5	0,243	0,907	0,212	0,261
AT3G01513.1	unknown protein	0,224	0,866	0,278	0,349	5	0,243	0,907	0,212	0,261
AT2G29490.1	ATGSTU1 GST19 GSTU1 glutathione S-transferase TAU 1	0,389	0,890	0,151	0,184	6	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G21680.1	DPP6 N-terminal domain-like protein	0,360	0,890	0,170	0,224	6	0,367	0,883	0,168	0,237
AT2G29480.1	ATGSTU2 GST20 GSTU2 glutathione S-transferase tau 2	0,345	0,896	0,160	0,231	6	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G17170.1	ATGSTU24 GST GSTU24 glutathione S-transferase TAU 24	0,369	0,881	0,175	0,240	6	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G77450.1	anac032 NAC032 NAC domain containing protein 32	0,392	0,871	0,166	0,245	6	0,367	0,883	0,168	0,237
AT5G64250.2	Aldolase-type TIM barrel family protein	0,344	0,870	0,187	0,298	6	0,367	0,883	0,168	0,237
AT1G75270.1	DHAR2 dehydroascorbate reductase 2	0,363	0,847	0,297	0,250	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT4G14030.1	SBP1 selenium-binding protein 1	0,339	0,832	0,326	0,293	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT5G66985.1	unknown protein	0,339	0,854	0,262	0,295	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT4G36052.1	other RNA	0,316	0,850	0,288	0,308	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT5G16300.2	Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein	0,288	0,797	0,429	0,313	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT4G36040.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	0,343	0,831	0,284	0,333	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT5G61800.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	0,344	0,819	0,328	0,320	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT5G57010.1	calmodulin-binding family protein	0,376	0,804	0,323	0,328	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT3G56980.1	BHLH039 ORG3 basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,357	0,809	0,298	0,359	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT5G07900.1	Mitochondrial transcription termination factor family protein	0,289	0,816	0,329	0,378	7	0,336	0,826	0,317	0,318
AT5G61820.1	unknown	0,507	0,829	0,136	0,192	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT1G60730.2	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	0,498	0,811	0,201	0,230	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT4G01870.1	tolB protein-related	0,431	0,842	0,183	0,267	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT2G15480.2	UGT73B5 UDP-glucosyl transferase 73B5	0,435	0,822	0,254	0,265	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT3G14660.1	CYP72A13 cytochrome P450 family 72 subfamily A polypeptide 13	0,394	0,841	0,224	0,295	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT2G05400.2	Ubiquitin-specific protease family C19-related protein	0,484	0,802	0,181	0,299	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT5G13080.1	WRKY75 ATWRKY75 WRKY DNA-binding protein 75	0,411	0,823	0,235	0,314	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT1G78380.1	ATGSTU19 GST8 GSTU19 glutathione S-transferase TAU 19	0,441	0,793	0,246	0,341	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT4G02380.1	SAG21 ALEA5 senescence-associated gene 21	0,434	0,795	0,275	0,322	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT4G19880.3	Glutathione S-transferase family protein	0,372	0,830	0,216	0,355	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT1G01720.1	ATAF1 ANAC002	0,388	0,817	0,156	0,396	8	0,433	0,817	0,204	0,309
AT5G48400.1	ATGLR1.2 GLR1.2 Glutamate receptor family	0,405	0,795	0,137	0,431	8	0,433	0,817	0,204	0,309

	protein									
AT1G78340.1	ATGSTU22 GSTU22 glutathione S-transferase TAU 22	0,489	0,792	0,276	0,240	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT2G02930.1	ATGSTF3 GST16 GSTF3 glutathione S-transferase F3	0,551	0,761	0,213	0,270	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT2G47890.2	B-box type zinc finger protein with CCT domain	0,531	0,739	0,301	0,286	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT3G44300.1	NIT2 AtNIT2 nitrilase 2	0,475	0,766	0,307	0,306	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT1G68620.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,539	0,748	0,230	0,311	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT2G05400.1	Ubiquitin-specific protease family C19-related protein	0,538	0,755	0,227	0,300	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT5G13750.3	ZIFL1 zinc induced facilitator-like 1	0,496	0,762	0,279	0,310	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT1G60730.3	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	0,542	0,747	0,234	0,306	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT1G76520.2	Auxin efflux carrier family protein	0,541	0,735	0,266	0,310	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT1G79410.1	AtOCT5 5-Oct organic cation/carnitine transporter5	0,557	0,721	0,267	0,314	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT2G33710.1	Integrase-type DNA-binding superfamily protein	0,539	0,719	0,302	0,318	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT1G02850.5	BGLU11 beta glucosidase 11	0,496	0,768	0,217	0,344	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT4G13180.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,513	0,760	0,189	0,352	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT3G53480.1	PIS1 PDR9 ATPDR9 ABCG37 pleiotropic drug resistance 9	0,487	0,739	0,293	0,363	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT3G14990.3	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	0,496	0,740	0,265	0,368	9	0,519	0,750	0,258	0,313
AT3G45100.1	SETH2 UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	0,518	0,705	0,359	0,325	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT1G65690.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family	0,556	0,685	0,338	0,327	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT4G37030.1	unknown protein	0,498	0,713	0,361	0,337	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT1G13520.1	Protein of unknown function (DUF1262)	0,566	0,663	0,363	0,329	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT4G23880.1	unknown protein	0,418	0,738	0,385	0,365	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT1G53850.1	PAE1 ATPAE1 20S proteasome alpha subunit E1	0,576	0,660	0,364	0,317	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT5G22140.2	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	0,443	0,750	0,333	0,361	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT4G24160.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,522	0,712	0,315	0,349	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT1G69600.1	ZFHD1 ATHB29 ZHD11 zinc finger homeodomain 1	0,570	0,666	0,349	0,332	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT5G08350.1	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related	0,412	0,633	0,577	0,312	10	0,508	0,692	0,374	0,335
AT4G25400.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,656	0,658	0,287	0,233	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT1G18970.1	GLP4 germin-like protein 4	0,586	0,719	0,264	0,264	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT3G21260.2	GLTP3 Glycolipid transfer protein (GLTP) family protein	0,576	0,693	0,338	0,272	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT5G13320.1	PBS3 GDG1 WIN3 GH3.12 Auxin-responsive GH3 family protein	0,628	0,686	0,266	0,253	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT1G21120.1	O-methyltransferase family protein	0,638	0,658	0,304	0,261	11	0,612	0,677	0,287	0,286

AT3G23560.1	ALF5 MATE efflux family protein	0,597	0,696	0,273	0,290	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT1G58320.1	PLAC8 family protein	0,631	0,671	0,257	0,292	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT1G13590.1	ATPSK1 PSK1 phytosulfokine 1 precursor	0,595	0,689	0,287	0,298	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT3G14075.1	Mono-/di-acylglycerol lipase N-terminal;Lipase class 3	0,655	0,658	0,226	0,295	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT5G26920.2	CBP60G Cam-binding protein 60-like G	0,610	0,660	0,319	0,300	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT5G24090.1	ATCHIA CHIA chitinase A	0,582	0,687	0,300	0,315	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT5G45380.1	ATDUR3 DUR3 solute:sodium symporters;urea transmembrane transporters	0,600	0,664	0,312	0,320	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT1G67810.1	SUFE2 sulfur E2	0,599	0,666	0,302	0,327	11	0,612	0,677	0,287	0,286
AT3G25190.1	Vacuolar iron transporter (VIT) family protein	0,610	0,754	0,153	0,191	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT2G15480.1	UGT73B5 UDP-glucosyl transferase 73B5	0,607	0,734	0,244	0,183	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT4G34138.1	UGT73B1 UDP-glucosyl transferase 73B1	0,632	0,710	0,215	0,224	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT5G06860.1	PGIP1 ATPGIP1 polygalacturonase inhibiting protein 1	0,611	0,735	0,190	0,223	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT3G09270.1	ATGSTU8 GSTU8 glutathione S-transferase TAU 8	0,627	0,699	0,248	0,238	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT2G25000.1	WRKY60 ATWRKY60 WRKY DNA-binding protein 60	0,622	0,704	0,229	0,256	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT3G06435.1	Expressed protein	0,623	0,700	0,247	0,246	12	0,619	0,719	0,218	0,223
AT1G07530.1	SCL14 ATGRAS2 GRAS2 SCARECROW-like 14	0,653	0,756	0,031	0,033	13	0,705	0,701	0,048	0,061
AT3G01345.1	Expressed protein	0,756	0,645	0,066	0,088	13	0,705	0,701	0,048	0,061
AT1G26390.1	FAD-binding Berberine family protein	0,676	0,627	0,319	0,221	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT3G28345.1	ABC transporter family protein	0,765	0,581	0,177	0,212	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT2G35980.1	YLS9 NHL10 ATNHL10	0,736	0,565	0,307	0,210	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT2G05510.6	Glycine-rich protein family	0,718	0,612	0,218	0,248	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT3G01970.1	WRKY45 ATWRKY45 WRKY DNA-binding protein 45	0,683	0,634	0,240	0,272	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT3G27940.1	LBD26 LOB domain-containing protein 26	0,672	0,617	0,312	0,267	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT3G47480.1	Calcium-binding EF-hand family protein	0,690	0,580	0,348	0,260	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT1G53625.1	unknown protein	0,680	0,612	0,293	0,278	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT5G34940.2	AtGUS3 GUS3 glucuronidase 3	0,690	0,600	0,279	0,294	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT3G50970.1	LTI30 XERO2 dehydrin family protein	0,708	0,581	0,279	0,289	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT1G67980.1	CCOAMT caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	0,750	0,546	0,183	0,325	14	0,706	0,596	0,269	0,261
AT5G57220.1	CYP81F2 cytochrome P450 family 81 subfamily F polypeptide 2	0,659	0,611	0,324	0,296	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT2G47485.1	unknown protein	0,637	0,601	0,380	0,298	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT3G29780.1	RALFL27 ralfl-like 27	0,656	0,602	0,316	0,328	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT5G25260.1	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family	0,643	0,617	0,302	0,339	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT2G19900.1	ATNADP-ME1 NADP-ME1 NADP-malic enzyme 1	0,652	0,606	0,293	0,349	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT2G29110.1	ATGLR2.8 GLR2.8 glutamate receptor 2.8	0,686	0,566	0,322	0,324	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT4G02280.1	SUS3 ATSUS3 sucrose synthase 3	0,679	0,565	0,313	0,349	15	0,666	0,574	0,317	0,351

AT2G29065.1	GRAS family transcription factor	0,656	0,591	0,287	0,371	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT5G03545.1	AT4 ATIPS2	0,692	0,563	0,276	0,357	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT2G47270.1	UPB1 sequence-specific DNA binding transcription factors;transcription regulators	0,711	0,503	0,339	0,356	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT2G15830.1	unknown protein	0,681	0,533	0,338	0,371	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT4G03723.1	BEST Arabidopsis thaliana protein match: zinc ion binding (TAIR:AT4G04775.1)	0,636	0,525	0,311	0,472	15	0,666	0,574	0,317	0,351
AT5G46845.1	MIR160C MIR160 MIR160/MIR160C (MICRORNA160); miRNA	0,676	0,501	0,498	0,212	16	0,676	0,501	0,498	0,212
AT2G42850.1	CYP718 cytochrome P450 family 718	0,789	0,447	0,335	0,257	17	0,777	0,465	0,321	0,277
AT3G46340.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,765	0,482	0,307	0,297	17	0,777	0,465	0,321	0,277
AT4G28040.4	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein	0,806	0,405	0,375	0,217	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT4G13390.1	Proline-rich extensin-like family protein	0,811	0,373	0,370	0,258	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT3G29639.1	unknown protein	0,831	0,375	0,316	0,263	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT3G54580.1	Proline-rich extensin-like family protein	0,812	0,323	0,402	0,274	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT5G57530.1	XTH12 AtXTH12 xyloglucan endotransglucosylase/hydro lase 12	0,798	0,346	0,391	0,302	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT4G07960.1	ATCSLC12 CSLC12 Cellulose-synthase-like C12	0,800	0,361	0,354	0,322	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT3G49960.1	Peroxidase superfamily protein	0,834	0,331	0,330	0,292	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT1G01560.1	ATMPK11 MPK11 MAP kinase 11	0,767	0,357	0,361	0,393	18	0,807	0,359	0,362	0,290
AT2G32840.1	proline-rich family protein	0,925	0,248	0,249	0,147	19	0,890	0,297	0,245	0,233
AT2G16430.1	PAP10 ATPAP10 purple acid phosphatase 10	0,882	0,344	0,206	0,247	19	0,890	0,297	0,245	0,233
AT2G18750.2	Calmodulin-binding protein	0,860	0,349	0,231	0,293	19	0,890	0,297	0,245	0,233
AT2G20520.1	FLA6 FASCICLIN-like arabinogalactan 6	0,912	0,252	0,247	0,208	19	0,890	0,297	0,245	0,233
AT4G28850.1	XTH26 AtXTH26 xyloglucan endotransglucosylase/hydro lase 26	0,870	0,292	0,291	0,270	19	0,890	0,297	0,245	0,233
AT4G38810.1	Calcium-binding EF-hand family protein	0,727	0,402	0,532	0,166	20	0,727	0,402	0,532	0,166
AT5G03240.2	UBQ3 polyubiquitin 3	0,792	0,256	0,548	0,086	21	0,792	0,256	0,548	0,086
AT2G42130.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	0,713	0,127	0,599	0,341	22	0,713	0,127	0,599	0,341
AT3G61898.1	unknown protein	0,621	0,149	0,699	0,321	23	0,664	0,081	0,692	0,252
AT3G01316.1	snoRNA	0,692	0,047	0,705	0,146	23	0,664	0,081	0,692	0,252
AT2G41430.3	ERD15 LSR1 CID1 dehydration-induced protein (ERD15)	0,708	0,063	0,678	0,189	23	0,664	0,081	0,692	0,252
AT2G30520.2	RPT2 Phototropic-responsive NPH3 family protein	0,636	0,064	0,684	0,351	23	0,664	0,081	0,692	0,252
AT3G58193.1	snoRNA	0,499	0,088	0,843	0,178	24	0,525	0,072	0,831	0,167
AT1G78206.1	MIR775A MIR775a; miRNA	0,551	0,056	0,818	0,156	24	0,525	0,072	0,831	0,167
AT3G41761.1	other RNA	0,518	0,167	0,741	0,393	25	0,463	0,124	0,810	0,313
AT4G36690.2	ATU2AF65A U2 snRNP auxilliary factor large subunit splicing factor	0,407	0,082	0,879	0,233	25	0,463	0,124	0,810	0,313
AT1G65620.2	AS2 Lateral organ boundaries (LOB) domain family protein	0,261	0,309	0,842	0,357	26	0,326	0,248	0,827	0,374



AT5G47980.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,362	0,274	0,822	0,343	26	0,326	0,248	0,827	0,374
AT5G56030.1	HSP81-2 ERD8 HSP90.2 AtHsp90.2 heat shock protein 81-2	0,306	0,272	0,829	0,380	26	0,326	0,248	0,827	0,374
AT4G03292.1	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H-like superfamily protein	0,398	0,228	0,830	0,319	26	0,326	0,248	0,827	0,374
AT5G61420.1	MYB28 HAG1 AtMYB28 PMG1 myb domain protein 28	0,303	0,158	0,813	0,471	26	0,326	0,248	0,827	0,374
AT1G63380.2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,289	0,533	0,736	0,301	27	0,321	0,420	0,795	0,280
AT2G28760.1	UXS6 UDP-XYL synthase 6	0,319	0,390	0,829	0,243	27	0,321	0,420	0,795	0,280
AT3G13060.1	ECT5 evolutionarily conserved C-terminal region 5	0,355	0,336	0,820	0,297	27	0,321	0,420	0,795	0,280
AT2G25880.1	AtAUR2 AUR2 ataurora2	0,337	0,398	0,736	0,432	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT1G54440.1	Polynucleotidyl transferase ribonuclease H fold protein with HRDC domain	0,265	0,349	0,781	0,445	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT2G26150.2	ATHSFA2 HSFA2 heat shock transcription factor A2	0,336	0,346	0,746	0,460	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT4G35790.1	ATPLDELTA PLDDELTA phospholipase D delta	0,297	0,332	0,779	0,442	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT3G47540.1	Chitinase family protein	0,267	0,375	0,748	0,477	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT3G62760.1	ATGSTF13 Glutathione S-transferase family protein	0,348	0,356	0,706	0,503	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT3G57490.1	Ribosomal protein S5 family protein	0,349	0,347	0,717	0,494	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT5G48000.5	CYP708A2 THAH THAH1 cytochrome P450 family 708 subfamily A polypeptide 2	0,257	0,311	0,804	0,437	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT4G15393.3	CYP702A5 cytochrome P450 family 702 subfamily A polypeptide 5	0,341	0,293	0,770	0,452	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT5G59990.2	CCT motif family protein	0,345	0,326	0,725	0,499	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT5G52710.1	Copper transport protein family	0,314	0,325	0,725	0,520	28	0,314	0,342	0,749	0,469
AT5G33355.1	Defensin-like (DEFL) family protein	0,310	0,452	0,646	0,532	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT3G61400.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	0,312	0,449	0,653	0,524	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT1G48510.1	Surfeit locus 1 cytochrome c oxidase biogenesis protein	0,303	0,457	0,622	0,559	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT4G31355.1	unknown protein	0,292	0,425	0,682	0,519	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT3G45720.1	Major facilitator superfamily protein	0,281	0,417	0,680	0,534	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT3G03190.1	ATGSTF11 ATGSTF6 GSTF11 glutathione S-transferase F11	0,337	0,374	0,687	0,524	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT1G09530.2	PIF3 POC1 PAP3 phytochrome interacting factor 3	0,324	0,356	0,661	0,576	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT3G29250.2	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,322	0,352	0,660	0,581	29	0,310	0,410	0,661	0,544
AT4G17590.1	unknown protein	0,103	0,608	0,572	0,541	30	0,155	0,578	0,535	0,586
AT4G25450.2	ATNAP8 NAP8 non-intrinsic ABC protein 8	0,118	0,549	0,606	0,563	30	0,155	0,578	0,535	0,586
AT4G33650.1	ADL2 DRP3A dynamin-related protein 3A	0,161	0,636	0,399	0,640	30	0,155	0,578	0,535	0,586
AT5G51440.1	HSP20-like chaperones superfamily protein	0,237	0,518	0,564	0,598	30	0,155	0,578	0,535	0,586
AT5G09710.1	Magnesium transporter CorA-like family protein	0,258	0,441	0,535	0,673	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT5G38100.2	S-adenosyl-L-methionine-dependent	0,292	0,344	0,657	0,605	31	0,284	0,345	0,612	0,651

	methyltransferases superfamily protein									
AT1G15610.2	unknown protein	0,317	0,361	0,613	0,627	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT4G22212.1	Arabidopsis defensin-like protein	0,239	0,364	0,637	0,636	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT5G22555.1	unknown protein	0,298	0,366	0,614	0,632	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT5G14200.3	isopropylmalate dehydrogenase 1	0,311	0,345	0,641	0,611	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT4G30250.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0,278	0,377	0,569	0,676	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT2G43100.1	IPMI2 ATLEUD1 isopropylmalate isomerase 2	0,310	0,348	0,618	0,633	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT2G18193.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	0,291	0,356	0,610	0,646	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT3G62530.1	ARM repeat superfamily protein	0,296	0,349	0,605	0,651	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT3G23510.1	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	0,304	0,340	0,620	0,638	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT3G58270.2	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) with TRAF-like domain	0,298	0,329	0,639	0,628	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT2G26370.1	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	0,296	0,325	0,634	0,637	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT1G65370.1	TRAF-like family protein	0,245	0,345	0,587	0,690	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT1G45015.2	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	0,313	0,323	0,628	0,635	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT1G23310.1	GGT1 AOAT1 GGAT1 glutamate:glyoxylate aminotransferase	0,221	0,350	0,581	0,701	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT4G12550.1	AIR1 Auxin-Induced in Root cultures 1	0,240	0,329	0,643	0,649	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT4G12870.1	Gamma interferon responsive lysosomal thiol (GILT) reductase family protein	0,300	0,333	0,605	0,658	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT3G50440.1	ATMES10 MES10 methyl esterase 10	0,294	0,326	0,624	0,646	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT2G28950.1	ATEXPA6 ATEXP6 ATHEXP ALPHA 1.8 EXPA6 expansin A6	0,326	0,328	0,596	0,657	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT1G35290.1	Thioesterase superfamily protein	0,288	0,332	0,599	0,669	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT5G23010.1	MAM1 IMS3 methylthioalkylmalate synthase 1	0,258	0,309	0,610	0,682	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT3G45160.1	Putative membrane lipoprotein	0,267	0,304	0,603	0,687	31	0,284	0,345	0,612	0,651
AT2G46650.1	B5 #1 ATCB5-C CB5-C cytochrome B5 isoform C	0,327	0,334	0,667	0,580	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT4G21903.2	MATE efflux family protein	0,270	0,321	0,698	0,581	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT1G35625.1	RING/U-box superfamily protein	0,303	0,323	0,678	0,587	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT5G23840.2	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	0,259	0,308	0,678	0,615	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT2G39700.1	ATEXPA4 ATEXP4 ATHEXP ALPHA 1.6 EXPA4 expansin A4	0,332	0,311	0,667	0,590	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT1G66800.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,305	0,302	0,673	0,602	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT1G03410.1	2A6 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	0,267	0,296	0,691	0,603	32	0,280	0,276	0,706	0,585

AT5G47990.1	CYP705A5 THAD THAD1 cytochrome P450 family 705 subfamily A polypeptide 5	0,208	0,276	0,778	0,525	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT3G20940.1	CYP705A30 cytochrome P450 family 705 subfamily A polypeptide 30	0,267	0,276	0,738	0,555	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT3G59730.1	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	0,360	0,267	0,712	0,540	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT4G37850.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,271	0,291	0,705	0,587	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT1G16400.1	CYP79F2 cytochrome P450 family 79 subfamily F polypeptide 2	0,340	0,269	0,681	0,590	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT4G13770.1	CYP83A1 REF2 cytochrome P450 family 83 subfamily A polypeptide 1	0,280	0,270	0,694	0,606	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT5G61290.1	Flavin-binding monooxygenase family protein	0,233	0,260	0,718	0,602	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT5G42590.1	CYP71A16 cytochrome P450 family 71 subfamily A polypeptide 16	0,231	0,226	0,757	0,568	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT3G58990.1	IPM1 isopropylmalate isomerase 1	0,263	0,251	0,695	0,620	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT3G02020.1	AK3 aspartate kinase 3	0,248	0,234	0,701	0,627	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT4G36220.1	FAH1 CYP84A1 ferulic acid 5-hydroxylase 1	0,286	0,223	0,728	0,582	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT1G70830.4	MLP28 MLP-like protein 28	0,277	0,208	0,755	0,558	32	0,280	0,276	0,706	0,585
AT3G61830.1	ARF18 auxin response factor 18	0,376	0,262	0,677	0,576	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT4G32460.2	Protein of unknown function DUF642	0,375	0,266	0,640	0,615	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT1G64390.1	AtGH9C2 GH9C2 glycosyl hydrolase 9C2	0,347	0,245	0,660	0,620	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT2G34490.1	CYP710A2 cytochrome P450 family 710 subfamily A polypeptide 2	0,298	0,221	0,683	0,629	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT5G58960.1	GIL1 Plant protein of unknown function (DUF641)	0,360	0,187	0,676	0,615	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT4G11190.1	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein	0,304	0,177	0,711	0,609	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT4G27440.1	PORB protochlorophyllide oxidoreductase B	0,395	0,102	0,668	0,622	33	0,351	0,209	0,674	0,612
AT3G28040.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,480	0,262	0,617	0,566	34	0,487	0,178	0,591	0,613
ATCG00400.1	TRNL.1 tRNA-Leu	0,549	0,181	0,608	0,544	34	0,487	0,178	0,591	0,613
ATCG00410.1	TRNF chloroplast TRNF	0,480	0,208	0,552	0,649	34	0,487	0,178	0,591	0,613
AT1G55120.2	ATFRUCT5 FRUCT5 beta-fructofuranosidase 5	0,491	0,188	0,594	0,609	34	0,487	0,178	0,591	0,613
AT1G26230.1	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	0,492	0,205	0,548	0,645	34	0,487	0,178	0,591	0,613
ATCG00450.1	TRNV.1 tRNA-Val	0,523	0,168	0,639	0,539	34	0,487	0,178	0,591	0,613
ATCG00440.1	NDHC NADH:ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase chain 3 protein	0,436	0,185	0,579	0,664	34	0,487	0,178	0,591	0,613
ATCG00250.1	TRNE this chloroplast gene encodes a UUC tRNA whose expression is regulated by SIG2.	0,481	0,127	0,588	0,638	34	0,487	0,178	0,591	0,613
ATCG00240.1	TRNY tRNA-Tyr	0,455	0,084	0,591	0,661	34	0,487	0,178	0,591	0,613
AT4G18390.2	TCP2 TEOSINTE BRANCHED 1 cycloidea and PCF transcription factor 2	0,490	0,315	0,495	0,645	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT4G27120.1	unknown	0,535	0,335	0,424	0,650	35	0,489	0,271	0,509	0,648

AT1G67910.1	unknown protein	0,553	0,291	0,498	0,601	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT4G33010.2	AtGLDP1 GLDP1 glycine decarboxylase P-protein 1	0,470	0,285	0,569	0,612	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT2G16200.1	structural molecules	0,606	0,284	0,389	0,633	35	0,489	0,271	0,509	0,648
ATCG01040.1	YCF5 Cytochrome C assembly protein	0,482	0,266	0,549	0,629	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT3G23810.1	SAHH2 ATSAHH2 S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase 2	0,434	0,280	0,587	0,624	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT4G27520.1	ENODL2 AtENODL2 early nodulin-like protein 2	0,432	0,274	0,583	0,631	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT1G72610.1	GLP1 ATGER1 GER1 germin-like protein 1	0,448	0,276	0,493	0,693	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT5G38410.3	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	0,476	0,259	0,456	0,706	35	0,489	0,271	0,509	0,648
ATCG00030.1	TRNK TRNK-UUU TRNA LYS Lysine tRNA	0,455	0,226	0,560	0,655	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT5G60940.1	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	0,511	0,229	0,474	0,680	35	0,489	0,271	0,509	0,648
ATCG01150.1	TRNR.3 tRNA-Arg	0,469	0,203	0,537	0,672	35	0,489	0,271	0,509	0,648
AT3G23050.2	IAA7 AXR2 indole-3-acetic acid 7	0,399	0,320	0,561	0,651	36	0,395	0,311	0,520	0,689
ATCG00070.1	PSBK photosystem II reaction center protein K precursor	0,393	0,328	0,549	0,661	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G73020.1	unknown protein	0,411	0,315	0,547	0,658	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT2G33050.1	AtRLP26 RLP26 receptor like protein 26	0,367	0,338	0,532	0,684	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G62560.1	FMO GS-OX3 flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 3	0,417	0,322	0,517	0,675	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT5G22500.1	FAR1 fatty acid reductase 1	0,419	0,315	0,546	0,654	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT2G03980.1	GDLS-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,404	0,331	0,514	0,681	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT2G05310.1	unknown protein	0,398	0,323	0,532	0,674	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G03600.1	PSB27 photosystem II family protein	0,399	0,332	0,500	0,693	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G58602.2	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	0,368	0,346	0,495	0,707	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT2G20260.1	PSAE-2 photosystem I subunit E-2	0,371	0,330	0,539	0,680	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT3G62750.1	BGLU8 beta glucosidase 8	0,368	0,344	0,472	0,724	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT3G26060.2	ATPRX Q Thioredoxin superfamily protein	0,388	0,337	0,472	0,716	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT4G09650.1	ATPD ATP synthase delta-subunit gene	0,393	0,324	0,523	0,683	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT5G62470.2	MYB96 myb domain protein 96	0,410	0,317	0,551	0,654	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G01140.3	CIPK9 PKS6 CBL-interacting protein kinase 9	0,380	0,327	0,516	0,694	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G78970.1	LUP1 ATLUP1 lupeol synthase 1	0,400	0,325	0,493	0,701	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT5G52970.1	thylakoid lumen 15.0 kDa protein	0,401	0,293	0,553	0,669	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G10640.1	Pectin lyase-like superfamily protein	0,389	0,299	0,551	0,675	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT2G23670.1	YCF37 homolog of Synechocystis YCF37	0,377	0,321	0,482	0,723	36	0,395	0,311	0,520	0,689
ATCG00710.1	PSBH photosystem II reaction center protein H	0,419	0,292	0,561	0,651	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT3G16520.3	UGT88A1 UDP-glucosyl transferase 88A1	0,370	0,308	0,525	0,702	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G19670.1	ATCLH1 COR11 ATHCOR1 CLH1 chlorophyllase 1	0,383	0,304	0,526	0,696	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT4G27440.2	PORB protochlorophyllide	0,404	0,302	0,500	0,704	36	0,395	0,311	0,520	0,689

	oxidoreductase B									
AT2G27402.1	unknown protein	0,395	0,316	0,471	0,723	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT4G21840.1	ATMSRB8 MSRB8 methionine sulfoxide reductase B8	0,435	0,304	0,478	0,700	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT4G29030.1	Putative membrane lipoprotein	0,367	0,294	0,507	0,722	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT2G19650.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	0,415	0,279	0,498	0,709	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G04800.1	glycine-rich protein	0,415	0,278	0,506	0,703	36	0,395	0,311	0,520	0,689
ATCG01010.1	NDHF NADH-Ubiquinone oxidoreductase (complex I) chain 5 protein	0,419	0,262	0,537	0,684	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT5G52780.1	Protein of unknown function (DUF3464)	0,385	0,258	0,527	0,712	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT3G57130.1	BOP1 Ankyrin repeat family protein / BTB/POZ domain-containing protein	0,384	0,271	0,542	0,697	36	0,395	0,311	0,520	0,689
AT1G10360.1	ATGSTU18 GST29 GSTU18 glutathione S-transferase TAU 18	0,350	0,340	0,536	0,689	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G38230.1	ATPDX1.1 PDX1.1 pyridoxine biosynthesis 1.1	0,338	0,336	0,542	0,692	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G45180.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,315	0,344	0,538	0,702	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G66190.2	ATLFNR1 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1	0,324	0,332	0,536	0,705	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G55240.1	Plant protein 1589 of unknown function	0,329	0,335	0,529	0,707	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G03270.1	CYCD6;1 Cyclin D6;1	0,352	0,317	0,575	0,668	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G19380.1	Long-chain fatty alcohol dehydrogenase family protein	0,332	0,331	0,546	0,695	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G38520.2	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,354	0,319	0,557	0,680	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G67280.1	RLK receptor-like kinase	0,376	0,303	0,581	0,655	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G49430.1	LACS2 LRD2 long-chain acyl-CoA synthetase 2	0,326	0,305	0,589	0,673	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G34760.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	0,323	0,321	0,553	0,698	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G53280.1	CYP71B5 cytochrome p450 71b5	0,327	0,314	0,564	0,691	37	0,345	0,294	0,560	0,692
ATCG00090.1	TRNS.1 tRNA-Ser	0,365	0,314	0,540	0,691	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G14700.2	PAP3 ATPAP3 purple acid phosphatase 3	0,337	0,320	0,538	0,703	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G01050.1	TROL thylakoid rhodanese-like	0,345	0,313	0,535	0,705	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G18080.1	BGLU44 B-S glucosidase 44	0,363	0,301	0,545	0,693	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G19600.1	SULTR3;5 sulfate transporter 3;5	0,343	0,309	0,556	0,691	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G30730.1	unknown protein	0,376	0,276	0,599	0,652	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G57800.1	FLP1 YRE CER3 WAX2 Fatty acid hydroxylase superfamily	0,315	0,298	0,594	0,677	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G00400.1	GPAT8 AtGPAT8 glycerol-3-phosphate acyltransferase 8	0,342	0,301	0,579	0,676	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G28680.4	TYRDC L-tyrosine decarboxylase	0,321	0,298	0,560	0,703	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G68480.1	JAG C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein	0,313	0,293	0,592	0,683	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G43010.2	PIF4 SRL2 AtPIF4 phytochrome interacting factor 4	0,325	0,312	0,558	0,697	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G78478.1	MIR833A MIR833a; miRNA	0,360	0,285	0,594	0,661	37	0,345	0,294	0,560	0,692

AT1G65860.1	FMO GS-OX1 flavin-monoxygenase glucosinolate S-oxygenase 1	0,345	0,305	0,542	0,703	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G03770.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,311	0,296	0,571	0,700	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G39310.3	jacalin-related lectin 22	0,316	0,301	0,560	0,704	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G62030.3	ROC4 rotamase CYP 4	0,325	0,283	0,574	0,696	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G01600.1	anac044 NAC044 NAC domain containing protein 44	0,331	0,290	0,580	0,686	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G51600.1	LTP5 lipid transfer protein 5	0,387	0,279	0,559	0,678	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G01530.1	LHCB4.1 light harvesting complex photosystem II	0,356	0,297	0,527	0,712	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G78490.1	CYP708A3 cytochrome P450 family 708 subfamily A polypeptide 3	0,323	0,289	0,558	0,707	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G21500.1	unknown protein	0,360	0,279	0,542	0,706	37	0,345	0,294	0,560	0,692
ATCG01160.1	RRN5S	0,382	0,271	0,592	0,656	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G21280.2	PSBQ PSBQA PSBQ-1 photosystem II subunit QA	0,356	0,280	0,539	0,710	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT5G63530.2	ATFP3 FP3 farnesylated protein 3	0,336	0,275	0,566	0,701	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G35260.1	unknown protein	0,364	0,261	0,577	0,683	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G64670.1	BDG1 alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,362	0,277	0,531	0,714	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G06520.1	PSBX photosystem II subunit X	0,366	0,272	0,542	0,706	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G17245.1	RING/U-box superfamily protein	0,368	0,258	0,575	0,684	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT2G06850.1	EXGT-A1 EXT XTH4 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolyase 4	0,339	0,256	0,593	0,684	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G36570.1	ATRL3 RL3 RAD-like 3	0,327	0,277	0,550	0,717	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G69160.1	unknown protein	0,347	0,262	0,574	0,694	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT1G28670.1	ARAB-1 GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,352	0,249	0,567	0,702	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G17240.1	unknown protein	0,385	0,254	0,542	0,702	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G15630.1	Uncharacterised protein family (UPF0497)	0,380	0,236	0,552	0,704	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT3G47470.1	LHCA4 CAB4 light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4	0,360	0,248	0,565	0,700	37	0,345	0,294	0,560	0,692
AT4G16370.1	ATOPT3 OPT3 oligopeptide transporter	0,292	0,280	0,572	0,714	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT3G21670.1	Major facilitator superfamily protein	0,268	0,283	0,568	0,725	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT5G57780.1	unknown protein	0,307	0,276	0,561	0,717	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT4G21620.2	glycine-rich protein	0,312	0,273	0,570	0,709	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT2G26250.1	FDH KCS10 3-ketoacyl-CoA synthase 10	0,328	0,260	0,580	0,699	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT1G14630.1	unknown protein	0,304	0,265	0,576	0,711	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT5G45950.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,273	0,244	0,593	0,717	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT3G23450.1	unknown protein	0,301	0,254	0,579	0,714	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT5G14090.1	unknown protein	0,287	0,260	0,559	0,733	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT2G33850.1	unknown protein	0,270	0,255	0,591	0,716	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT1G72970.2	HTH EDA17 Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein	0,316	0,236	0,597	0,699	38	0,300	0,239	0,575	0,721

AT5G11420.1	Protein of unknown function DUF642	0,293	0,242	0,581	0,720	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT3G48200.1	unknown protein	0,286	0,251	0,562	0,735	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT5G07690.1	MYB29 ATMYP29 PMG2 myb domain protein 29	0,283	0,242	0,573	0,730	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT5G13140.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,314	0,238	0,556	0,732	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT5G25610.1	RD22 ATRD22 BURP domain-containing protein	0,272	0,237	0,582	0,729	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT1G55260.2	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,302	0,228	0,579	0,722	38	0,300	0,239	0,575	0,721
ATCG00420.1	NDHJ NADH dehydrogenase subunit J	0,356	0,226	0,549	0,722	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT2G26690.1	Major facilitator superfamily protein	0,303	0,224	0,587	0,716	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT1G69530.5	EXPA1 expansin A1	0,329	0,213	0,586	0,709	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT1G80100.1	AHP6 HP6 histidine phosphotransfer protein 6	0,251	0,237	0,579	0,738	38	0,300	0,239	0,575	0,721
ATCG01200.1	TRNI.3 tRNA-Ile	0,319	0,217	0,568	0,727	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT4G36250.1	ALDH3F1 aldehyde dehydrogenase 3F1	0,284	0,215	0,576	0,736	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT1G72645.1	unknown protein	0,265	0,213	0,573	0,745	38	0,300	0,239	0,575	0,721
ATCG00210.1	YCF6 electron transporter transferring electrons within cytochrome b6/f complex of photosystem IIs	0,346	0,204	0,570	0,717	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT3G20820.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0,287	0,202	0,606	0,714	38	0,300	0,239	0,575	0,721
ATCG00430.1	PSBG photosystem II reaction center protein G	0,357	0,181	0,564	0,723	38	0,300	0,239	0,575	0,721
AT4G24510.1	CER2 VC2 VC-2 HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,280	0,349	0,516	0,730	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G03210.2	XTH9 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolyase 9	0,305	0,338	0,532	0,714	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G08380.1	PSAO photosystem I subunit O	0,321	0,335	0,528	0,711	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G60260.1	BGLU5 beta glucosidase 5	0,335	0,345	0,504	0,717	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G13630.2	GUN5	0,326	0,320	0,515	0,726	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G24155.1	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein	0,286	0,323	0,538	0,724	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G24160.1	SQE6 squalene monooxygenase 6	0,286	0,317	0,557	0,713	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT3G08940.2	LHCB4.2 light harvesting complex photosystem II	0,320	0,338	0,476	0,746	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT2G32860.2	BGLU33 beta glucosidase 33	0,324	0,325	0,507	0,729	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT3G05600.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,289	0,319	0,535	0,727	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G21750.2	ATML1 Homeobox-leucine zipper family protein / lipid-binding START domain-containing protein	0,316	0,315	0,516	0,731	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT2G47240.2	LACS1 AMP-dependent synthetase and ligase family protein	0,276	0,309	0,523	0,745	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G66570.1	PSBO-1 OEE1 OEE33 OE33 PSBO1 MSP-1 PS II oxygen-evolving complex 1	0,305	0,313	0,524	0,731	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT3G26932.2	DRB3 dsRNA-binding protein 3	0,288	0,310	0,516	0,745	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G37930.1	SHM1 STM SHMT1 serine transhydroxymethyltransferase 1	0,315	0,303	0,533	0,724	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT2G20570.2	GPRI1 GBF's pro-rich region-interacting factor 1	0,339	0,308	0,500	0,735	39	0,314	0,289	0,525	0,735

AT1G51805.2	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,281	0,297	0,558	0,723	39	0,314	0,289	0,525	0,735
ATCG00330.1	RPS14 chloroplast ribosomal protein S14	0,323	0,299	0,519	0,733	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G09010.1	APX4 TL29 ascorbate peroxidase 4	0,351	0,292	0,524	0,719	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G58330.3	lactate/malate dehydrogenase family protein	0,329	0,289	0,531	0,726	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT2G46820.2	PTAC8 TMP14 PSAP PSI-P photosystem I P subunit	0,299	0,305	0,504	0,751	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G08150.1	KNAT1 BP BP1 KNOTTED-like from Arabidopsis thaliana	0,271	0,298	0,547	0,734	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G76100.1	PETE1 plastocyanin 1	0,302	0,297	0,524	0,739	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT3G48420.1	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	0,323	0,279	0,544	0,722	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G33000.3	CBL10 ATCBL10 calcineurin B-like protein 10	0,327	0,282	0,524	0,734	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G52410.2	TSA1 TSK-associating protein 1	0,321	0,279	0,549	0,720	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G13840.1	HXXXD-type acyl-transferase family protein	0,314	0,278	0,523	0,742	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G09340.1	CRB CSP41B HIP1.3 chloroplast RNA binding	0,313	0,276	0,539	0,732	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT3G43720.2	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,288	0,271	0,528	0,751	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G52220.3	BEST Arabidopsis thaliana protein match: photosystem I P subunit (TAIR:AT2G46820.2)	0,325	0,266	0,521	0,743	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT3G47295.1	unknown protein	0,336	0,254	0,520	0,743	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G47610.1	RING/U-box superfamily protein	0,294	0,248	0,534	0,753	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G68590.2	Ribosomal protein PSRP-3/Ycf65	0,342	0,259	0,508	0,747	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G01320.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,334	0,249	0,532	0,737	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G54780.1	TLP18.3 thylakoid lumen 18.3 kDa protein	0,299	0,262	0,515	0,760	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT5G22800.1	EMB86 EMB1030 EMB263 Alanyl-tRNA synthetase class IIc	0,290	0,253	0,540	0,749	39	0,314	0,289	0,525	0,735
ATCG00690.1	PSBT PSBTC photosystem II reaction center protein T	0,338	0,249	0,512	0,750	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G31330.1	PSAF photosystem I subunit F	0,345	0,247	0,529	0,735	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT2G26500.2	cytochrome b6f complex subunit (petM) putative	0,272	0,255	0,535	0,758	39	0,314	0,289	0,525	0,735
ATCG01190.1	TRNA.2 tRNA-Ala	0,365	0,234	0,520	0,736	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G29020.1	glycine-rich protein	0,314	0,243	0,532	0,748	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT1G03630.2	POR C PORC protochlorophyllide oxidoreductase C	0,360	0,223	0,502	0,754	39	0,314	0,289	0,525	0,735
AT4G10500.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	0,239	0,381	0,475	0,756	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT5G58140.4	PHOT2 NPL1 phototropin 2	0,248	0,344	0,507	0,751	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT1G61190.1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	0,270	0,348	0,429	0,789	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT1G77490.1	TAPX thylakoidal ascorbate peroxidase	0,245	0,335	0,483	0,771	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT3G63140.1	CSP41A chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa	0,254	0,322	0,469	0,782	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT3G18890.1	NAD(P)-binding Rossmann-	0,253	0,280	0,511	0,772	40	0,254	0,288	0,481	0,786



	fold superfamily protein									
AT5G09660.4	PMDH2 peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	0,231	0,282	0,474	0,801	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT2G10940.2	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,259	0,291	0,410	0,825	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT4G03280.2	PETC PGR1 photosynthetic electron transfer C	0,264	0,270	0,518	0,767	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT3G61310.1	AT hook motif DNA-binding family protein	0,309	0,259	0,481	0,779	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT5G44572.1	unknown protein	0,246	0,282	0,468	0,801	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT1G12900.4	GAPA-2 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit 2	0,259	0,266	0,508	0,777	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT3G07185.1	pre-tRNA	0,266	0,261	0,517	0,770	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT4G16980.1	arabinogalactan-protein family	0,286	0,255	0,485	0,787	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT4G10060.1	Beta-glucosidase GBA2 type family protein	0,247	0,256	0,503	0,788	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT3G26450.1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	0,223	0,262	0,494	0,799	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT2G05380.2	GRP3S glycine-rich protein 3 short isoform	0,251	0,246	0,437	0,828	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT1G06680.2	PSBP-1 OEE2 PSII-P photosystem II subunit P-1	0,223	0,239	0,486	0,810	40	0,254	0,288	0,481	0,786
AT3G47650.1	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	0,350	0,340	0,463	0,740	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT3G25880.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,384	0,345	0,357	0,778	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT2G39470.3	PPL2 PsbP-like protein 2	0,360	0,341	0,451	0,742	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT5G64770.1	RGF9 Encodes a root meristem growth factor (RGF)	0,363	0,341	0,382	0,779	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT4G38840.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	0,344	0,338	0,428	0,764	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT4G12830.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,344	0,328	0,450	0,756	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT1G21250.1	WAK1 PRO25 cell wall-associated kinase	0,376	0,317	0,415	0,765	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT5G56850.1	unknown protein	0,344	0,309	0,438	0,771	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT2G43620.1	Chitinase family protein	0,348	0,314	0,407	0,784	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT1G33600.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0,317	0,318	0,387	0,805	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT3G05730.1	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.	0,396	0,307	0,364	0,785	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT1G51110.1	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein	0,329	0,272	0,460	0,779	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT2G34430.1	LHB1B1 LHCB1.4 light-harvesting chlorophyll-protein complex II subunit B1	0,361	0,267	0,442	0,777	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT5G57300.2	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	0,342	0,271	0,398	0,807	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT5G61270.1	PIF7 phytochrome-interacting factor7	0,378	0,235	0,408	0,797	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT3G14210.1	ESM1 epithiospecifier modifier 1	0,378	0,200	0,416	0,802	41	0,357	0,303	0,417	0,777
AT1G21270.1	WAK2 wall-associated kinase 2	0,247	0,361	0,378	0,816	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT1G80660.1	AHA9 HA9 H(+)-ATPase 9	0,253	0,336	0,338	0,842	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT1G29510.1	SAUR68 SAUR-like auxin-responsive protein family	0,295	0,333	0,338	0,830	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT5G07100.1	WRKY26 WRKY DNA-binding protein 26	0,278	0,309	0,366	0,832	42	0,292	0,278	0,333	0,848

AT3G16660.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,303	0,277	0,313	0,857	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT5G44568.1	unknown protein	0,245	0,289	0,300	0,875	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT2G41090.1	Calcium-binding EF-hand family protein	0,248	0,230	0,301	0,891	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT2G33620.3	AT hook motif DNA-binding family protein	0,371	0,217	0,328	0,841	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT5G25980.3	TGG2 BGLU37 glucoside glucohydrolase 2	0,391	0,154	0,334	0,844	42	0,292	0,278	0,333	0,848
AT5G01900.1	WRKY62 ATWRKY62 WRKY DNA-binding protein 62	0,107	0,412	0,243	0,871	43	0,121	0,289	0,188	0,923
AT2G26400.1	ARD ATARD3 ARD3 acireductone dioxygenase 3	0,163	0,307	0,294	0,890	43	0,121	0,289	0,188	0,923
AT5G22570.1	WRKY38 ATWRKY38 WRKY DNA-binding protein 38	0,074	0,337	0,164	0,924	43	0,121	0,289	0,188	0,923
AT3G22231.1	PCC1 pathogen and circadian controlled 1	0,132	0,242	0,119	0,954	43	0,121	0,289	0,188	0,923
AT5G03350.1	Legume lectin family protein	0,131	0,146	0,118	0,974	43	0,121	0,289	0,188	0,923
AT3G01500.2	CA1 carbonic anhydrase 1	0,215	0,176	0,245	0,929	44	0,230	0,127	0,295	0,914
AT3G01500.3	CA1 carbonic anhydrase 1	0,226	0,163	0,318	0,906	44	0,230	0,127	0,295	0,914
AT1G49750.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	0,141	0,130	0,336	0,922	44	0,230	0,127	0,295	0,914
AT3G16670.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,276	0,087	0,221	0,931	44	0,230	0,127	0,295	0,914
AT2G24270.3	ALDH11A3 aldehyde dehydrogenase 11A3	0,294	0,077	0,357	0,883	44	0,230	0,127	0,295	0,914
AT1G32060.1	PRK phosphoribulokinase	0,157	0,259	0,400	0,865	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT1G66970.2	SVL2 SHV3-like 2	0,197	0,207	0,413	0,865	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT4G16990.5	RLM3 disease resistance protein (TIR-NBS class) putative	0,226	0,204	0,419	0,856	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT5G18030.1	SAUR-like auxin-responsive protein family	0,165	0,207	0,417	0,870	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT5G44580.1	unknown protein	0,264	0,196	0,429	0,841	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT2G35830.2	unknown protein	0,250	0,175	0,402	0,863	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT1G31580.1	ECS1 CXC750 ECS1	0,133	0,143	0,415	0,889	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT5G14740.5	CA2 CA18 BETA CA2 carbonic anhydrase 2	0,299	0,116	0,396	0,860	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT5G38420.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	0,238	0,108	0,438	0,860	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT3G22120.1	CWLP cell wall-plasma membrane linker protein	0,216	0,087	0,468	0,852	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT5G26000.2	TGG1 BGLU38 thioglucoside glucohydrolase 1	0,202	0,081	0,446	0,868	45	0,213	0,162	0,422	0,863
AT1G42970.1	GAPB glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit	0,200	0,193	0,494	0,824	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT5G38980.1	unknown protein	0,194	0,189	0,504	0,820	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT3G55800.1	SBPASE sedoheptulose-bisphosphatase	0,207	0,178	0,488	0,829	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT3G54050.1	HCEF1 high cyclic electron flow 1	0,159	0,173	0,469	0,851	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G78170.1	unknown protein	0,158	0,151	0,548	0,807	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT2G30570.1	PSBW photosystem II reaction center W	0,204	0,167	0,530	0,806	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G09310.1	Protein of unknown function DUF538	0,123	0,185	0,509	0,832	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G68530.2	CUT1 POP1 CER6 G2 KCS6 3-ketoacyl-CoA synthase 6	0,192	0,163	0,502	0,827	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT2G42220.1	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein	0,215	0,160	0,521	0,810	46	0,167	0,144	0,514	0,827

AT2G45190.1	AFO FIL YAB1 Plant-specific transcription factor YABBY family protein	0,194	0,145	0,541	0,806	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G44575.2	NPQ4 PSBS Chlorophyll A-B binding family protein	0,194	0,153	0,544	0,802	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G55670.1	PSAG photosystem I subunit G	0,183	0,153	0,515	0,823	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G20340.1	DRT112 PETE2 Cupredoxin superfamily protein	0,200	0,147	0,522	0,816	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT1G14440.2	AtHB31 HB31 ZHD4 homeobox protein 31	0,173	0,136	0,500	0,838	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT2G21330.3	FBA1 fructose-bisphosphate aldolase 1	0,174	0,124	0,494	0,843	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT4G10340.1	LHCB5 light harvesting complex of photosystem II 5	0,194	0,120	0,532	0,816	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT3G14420.6	Aldolase-type TIM barrel family protein	0,132	0,119	0,488	0,855	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT4G28750.1	PSAE-1 Photosystem I reaction centre subunit IV / PsaE protein	0,179	0,113	0,534	0,819	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT5G42530.1	unknown protein	0,086	0,104	0,498	0,857	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT5G38430.1	Ribulose bisphosphate carboxylase (small chain) family protein	0,077	0,087	0,485	0,867	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT2G15050.1	LTP LTP7 lipid transfer protein	0,069	0,054	0,574	0,814	46	0,167	0,144	0,514	0,827
AT3G59400.1	GUN4 enzyme binding;tetrapyrrole binding	0,235	0,230	0,560	0,760	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G04890.1	PDF2 protodermal factor 2	0,253	0,243	0,527	0,774	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT5G54770.1	THI1 TZ THI4 thiazole biosynthetic enzyme chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)	0,210	0,242	0,573	0,754	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G32470.1	Single hybrid motif superfamily protein	0,237	0,237	0,546	0,767	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT5G07180.1	ERL2 ERECTA-like 2	0,235	0,239	0,530	0,779	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G05540.1	Glycine-rich protein family	0,205	0,244	0,517	0,794	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G55330.1	PPL1 PsbP-like protein 1	0,275	0,228	0,500	0,789	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G23000.1	scpl10 serine carboxypeptidase-like 10	0,186	0,226	0,559	0,776	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G46780.1	PTAC16 plastid transcriptionally active 16	0,291	0,223	0,530	0,765	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G27300.1	S-locus lectin protein kinase family protein	0,201	0,230	0,579	0,756	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT5G23060.1	CaS calcium sensing receptor	0,264	0,225	0,532	0,773	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G12800.1	PSAL photosystem I subunit I	0,253	0,217	0,542	0,771	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G26650.1	GAPA GAPA-1 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit	0,272	0,206	0,507	0,791	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G21650.1	Subtilase family protein	0,297	0,195	0,546	0,759	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G70760.1	CRR23 inorganic carbon transport protein-related	0,247	0,219	0,511	0,794	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G32900.1	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	0,210	0,208	0,546	0,784	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G29660.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,235	0,204	0,522	0,794	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G38970.2	FBA2 fructose-bisphosphate aldolase 2	0,214	0,200	0,581	0,759	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G15820.1	LHCB6 CP24 light harvesting complex photosystem II subunit 6	0,245	0,205	0,506	0,801	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G16140.1	PSAH-1 photosystem I subunit H-1	0,244	0,207	0,524	0,789	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G39730.3	RCA rubisco activase	0,257	0,193	0,578	0,750	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G61470.1	LHCA2 photosystem I light harvesting complex gene 2	0,228	0,197	0,517	0,801	47	0,245	0,202	0,534	0,782

AT1G30380.1	PSAK photosystem I subunit K	0,283	0,199	0,516	0,784	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G26910.1	PDR4 ATPDR4 pleiotropic drug resistance 4	0,231	0,183	0,574	0,764	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G61520.3	LHCA3 photosystem I light harvesting complex gene 3	0,263	0,195	0,578	0,748	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G52220.2	unknown protein	0,290	0,195	0,528	0,774	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G05180.1	PSBQ PSBQ-2 PSII-Q photosystem II subunit Q-2	0,258	0,191	0,544	0,775	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT5G04140.2	GLU1 GLS1 GLUS FD-GOGAT glutamate synthase 1	0,235	0,186	0,537	0,788	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT5G53210.1	SPCH basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	0,259	0,169	0,524	0,793	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G20020.3	ATLFNR2 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2	0,253	0,189	0,478	0,820	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G34420.1	LHB1B2 LHCB1.5 photosystem II light harvesting complex gene B1B2	0,306	0,192	0,511	0,780	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G54050.2	HCEF1 high cyclic electron flow 1	0,222	0,186	0,531	0,796	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G68010.2	HPR hydroxypyruvate reductase	0,198	0,184	0,539	0,798	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT4G28080.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	0,265	0,180	0,519	0,792	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G26330.1	ER QRP1 Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein	0,245	0,173	0,494	0,816	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G64710.2	GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein	0,232	0,179	0,553	0,780	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G51805.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	0,231	0,196	0,491	0,817	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G38540.1	LP1 LTP1 ATLTP1 lipid transfer protein 1	0,279	0,162	0,529	0,785	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G56940.1	CRD1 CHL27 ACSF dicarboxylate diiron protein putative (Crd1)	0,261	0,174	0,555	0,771	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT1G78970.2	LUP1 ATLUP1 lupeol synthase 1	0,218	0,169	0,551	0,787	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT3G56940.2	CRD1 dicarboxylate diiron protein putative (Crd1)	0,225	0,154	0,526	0,806	47	0,245	0,202	0,534	0,782
AT2G15050.3	LTP LTP7 lipid transfer protein	0,179	0,205	0,584	0,765	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G27950.1	LTPG1 glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid protein transfer 1	0,223	0,191	0,592	0,751	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G51500.1	CER5 D3 ABCG12 WBC12 ATWBC12 ABC-2 type transporter family protein	0,196	0,198	0,578	0,767	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G39330.2	ATCAD9 CAD9 cinnamyl alcohol dehydrogenase 9	0,191	0,186	0,593	0,759	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT3G23290.2	LSH4 Protein of unknown function (DUF640)	0,166	0,175	0,564	0,790	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G45201.2	ATLL1 TLL1 triacylglycerol lipase-like 1	0,196	0,171	0,620	0,740	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT3G16530.1	Legume lectin family protein	0,167	0,178	0,584	0,774	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G13495.2	other RNA	0,166	0,174	0,583	0,776	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G24270.4	ALDH11A3 aldehyde dehydrogenase 11A3	0,222	0,173	0,574	0,769	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G32690.4	ATGRP23 GRP23 glycine-rich protein 23	0,232	0,167	0,583	0,760	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G29670.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,181	0,161	0,601	0,762	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G06360.1	Fatty acid desaturase family protein	0,212	0,136	0,600	0,759	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G33220.1	PME44 ATPME44 pectin	0,204	0,160	0,574	0,777	48	0,187	0,144	0,590	0,770

	methylesterase 44									
AT2G05070.1	LHCB2.2 LHCB2 photosystem II light harvesting complex gene 2.2	0,198	0,156	0,583	0,772	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT5G46110.4	APE2 TPT Glucose-6-phosphate/phosphate translocator-related	0,205	0,154	0,558	0,789	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G02770.1	PSAD-1 photosystem I subunit D-1	0,218	0,149	0,595	0,760	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G36870.1	XTH32 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolyase 32	0,233	0,150	0,559	0,781	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G45201.1	ATLL1 TLL1 triacylglycerol lipase-like 1	0,197	0,143	0,607	0,757	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT5G15780.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,240	0,137	0,567	0,776	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT3G04290.1	ATLTL1 LTL1 Li-tolerant lipase 1	0,234	0,131	0,584	0,766	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G38530.1	LTP2 LP2 cdf3 lipid transfer protein 2	0,165	0,136	0,597	0,773	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G17840.1	WBC11 ABCG11 DSO COF1 ATWBC11 white-brown complex homolog protein 11	0,196	0,138	0,572	0,785	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G24270.1	ALDH11A3 aldehyde dehydrogenase 11A3	0,194	0,128	0,614	0,755	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G52230.1	PSAH2 PSAH-2 PSI-H photosystem I subunit H2	0,216	0,137	0,597	0,760	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G70830.5	MLP28 MLP-like protein 28	0,161	0,143	0,630	0,746	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G36870.2	XTH32 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolyase 32	0,126	0,131	0,577	0,796	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G42840.1	PDF1 protodermal factor 1	0,185	0,119	0,619	0,754	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT5G67385.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	0,166	0,127	0,586	0,783	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G15050.2	LTP LTP7 lipid transfer protein	0,165	0,133	0,576	0,789	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT3G16370.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,169	0,120	0,617	0,759	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT3G21055.1	PSBTN photosystem II subunit T	0,189	0,129	0,557	0,798	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G37800.1	XTH7 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolyase 7	0,194	0,117	0,642	0,733	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT5G08000.1	E13L3 PDCB2 glucan endo-13-beta-glucosidase-like protein 3	0,184	0,115	0,594	0,775	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT5G54270.1	LHCB3 LHCB3*1 light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3	0,200	0,131	0,555	0,797	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT2G39010.1	PIP2E PIP2;6 plasma membrane intrinsic protein 2E	0,156	0,116	0,569	0,799	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G13495.1	other RNA	0,168	0,107	0,591	0,781	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT3G44970.1	Cytochrome P450 superfamily protein	0,086	0,105	0,606	0,784	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT4G38770.1	PRP4 ATPRP4 proline-rich protein 4	0,166	0,092	0,636	0,748	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT1G29930.1	CAB1 AB140 CAB140 LHCB1.3 chlorophyll A/B binding protein 1	0,143	0,078	0,608	0,777	48	0,187	0,144	0,590	0,770
AT5G01870.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,226	0,272	0,658	0,665	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT3G20470.1	GRP-5 ATGRP-5 GRP5 ATGRP5 glycine-rich protein 5	0,243	0,283	0,602	0,706	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT3G19710.1	BCAT4 branched-chain aminotransferase4	0,215	0,269	0,638	0,688	49	0,240	0,225	0,622	0,709

AT1G20620.5	CAT3 SEN2 ATCAT3 catalase 3	0,231	0,267	0,618	0,702	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G12545.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,206	0,252	0,646	0,691	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G65010.2	ASN2 asparagine synthetase 2	0,279	0,252	0,619	0,689	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G58390.1	Peroxidase superfamily protein	0,262	0,242	0,628	0,691	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G61520.2	LHCA3 photosystem I light harvesting complex gene 3	0,260	0,242	0,619	0,701	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G37130.1	NIA2 B29 NIA2-1 CHL3 NR NR2 ATNR2 nitrate reductase 2	0,224	0,290	0,589	0,720	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G28250.2	ATEXPB3 EXPB3 ATHEXP BETA 1.6 expansin B3	0,248	0,235	0,665	0,664	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT3G49110.1	PRX33 PRXCA ATPRX33 ATPCA peroxidase CA	0,232	0,232	0,617	0,715	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT2G16630.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,269	0,243	0,624	0,693	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G04223.1	other RNA	0,158	0,245	0,642	0,709	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G73602.1	CPuORF32 conserved peptide upstream open reading frame 32	0,252	0,248	0,605	0,714	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G23680.1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	0,232	0,247	0,583	0,738	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G13493.1	MIR850A MIR850a; miRNA	0,215	0,209	0,679	0,670	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G56430.1	ATNAS4 NAS4 nicotianamine synthase 4	0,191	0,221	0,627	0,722	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G67740.1	PSBY YCF32 photosystem II BY	0,262	0,228	0,597	0,724	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G78370.1	ATGSTU20 GSTU20 glutathione S-transferase TAU 20	0,232	0,220	0,622	0,715	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT2G42610.2	LSH10 Protein of unknown function (DUF640)	0,225	0,203	0,654	0,694	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G25960.1	PGP2 P-glycoprotein 2	0,235	0,215	0,590	0,742	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G24140.1	SQP2 squalene monooxygenase 2	0,222	0,202	0,657	0,692	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT2G21140.1	ATPRP2 PRP2 proline-rich protein 2	0,267	0,199	0,605	0,723	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT2G37640.1	ATEXPA3 ATEXP3 ATHEXP ALPHA 1.9 EXP3 Barwin-like endoglucanases superfamily protein	0,266	0,207	0,593	0,731	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT2G05520.6	GRP-3 ATGRP-3 glycine-rich protein 3	0,228	0,208	0,587	0,749	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G63180.1	Pectin lyase-like superfamily protein	0,265	0,196	0,616	0,715	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT2G30670.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	0,212	0,227	0,659	0,685	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G10180.1	AST68 SULTR2;1 slufate transporter 2;1	0,226	0,199	0,611	0,732	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G67090.2	RBCS1A ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1A	0,278	0,197	0,616	0,711	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G45670.1	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	0,253	0,172	0,642	0,703	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT5G14920.2	Gibberellin-regulated family protein	0,256	0,167	0,601	0,738	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G69530.4	ATEXPA1 EXP1 AT-EXP1 ATEXP1 ATHEXP ALPHA 1.2 EXPA1 expansin A1	0,264	0,167	0,600	0,736	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT1G21060.1	Protein of unknown function DUF547	0,284	0,153	0,615	0,720	49	0,240	0,225	0,622	0,709
AT4G22610.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,181	0,241	0,723	0,622	50	0,171	0,147	0,718	0,653

AT5G42580.1	CYP705A12 cytochrome P450 family 705 subfamily A polypeptide 12	0,188	0,225	0,734	0,612	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT2G24850.1	TAT3 TAT tyrosine aminotransferase 3	0,178	0,196	0,690	0,674	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT3G02620.1	Plant stearyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein	0,146	0,188	0,703	0,671	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT1G19350.5	BES1 BZR2 Brassinosteroid signalling positive regulator (BZR1) family protein	0,232	0,170	0,692	0,661	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT1G53480.2	MRD1 mto 1 responding down 1	0,126	0,164	0,729	0,652	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT3G44990.1	XTR8 ATXTR8 XTH31 xyloglucan endo-transglycosylase-related 8	0,264	0,148	0,707	0,640	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT1G73600.2	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	0,150	0,130	0,739	0,644	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT3G59060.4	PIL6 PIF5 phytochrome interacting factor 3-like 6	0,261	0,131	0,674	0,679	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT4G04223.2	other RNA	0,103	0,124	0,680	0,715	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT1G69530.2	ATEXPA1 EXP1 AT-EXP1 ATEXP1 ATHEXP ALPHA 1.2 EXPA1 expansin A1	0,219	0,115	0,726	0,642	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT5G42600.1	MRN1 marneral synthase	0,091	0,114	0,728	0,670	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT3G22142.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	0,182	0,100	0,666	0,716	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT4G22210.1	LCR85 low-molecular-weight cysteine-rich 85	0,073	0,088	0,786	0,608	50	0,171	0,147	0,718	0,653
AT3G59060.3	PIL6 PIF5 phytochrome interacting factor 3-like 6	0,176	0,068	0,788	0,586	50	0,171	0,147	0,718	0,653

## **7 Literaturverzeichnis**

- Aida, M. et al., 1997. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant cell*, 9(6), pp.841–57.
- Alanen, H.I. et al., 2003. Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(4), pp.367–74.
- Anderson, M., Chen, Z. & Klessig, D., 1998. Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochemistry*, 47(4), pp.555–566.
- Armstrong, R.N., 1991. Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), pp.131–40.
- Attallah, C. V et al., 2007. Characterization of Arabidopsis thaliana genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogenesis. *Plant Molecular Biology*, 65(3), pp.343–55.
- Babbs, C., Pham, J. & Coolbaugh, R., 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiology*, 90, pp.1267–1270.
- Baerson, S.R. et al., 2005. Detoxification and transcriptome response in Arabidopsis seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2(3H)-one. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(23), pp.21867–81.
- Ball, L. et al., 2004. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(9), pp.2448–62.
- Benfey, P.N., Ren, L. & Chua, N.H., 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *The EMBO Journal*, 8(8), pp.2195–202.
- Berendzen, K.W. et al., 2012. Bioinformatic cis-element analyses performed in Arabidopsis and rice disclose bZIP- and MYB-related binding sites as potential AuxRE-coupling elements in auxin-mediated transcription. *BMC Plant Biology*, 12(1), p.125.
- Berger, S. et al., 2007. Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58(4), pp.797–806.
- Beynon, E.R. et al., 2009. The role of oxophytodienoate reductases in the detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene by Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151(1), pp.253–61.



- Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, M.B., 2003. ATP-dependent reduction of cysteine – sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 425(October), pp.980–984.
- Bolle, C., 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, 218(5), pp.683–92.
- Bolle, C., Koncz, C. & Chua, N., 2000. PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes & Development*, 14, pp.1269–1278.
- Bolwell, G.P., Bozak, K. & Zimmerlin, A., 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, 37(6), pp.1491–506.
- Borsani, O., Valpuesta, V. & Botella, M. a, 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology*, 126(3), pp.1024–30.
- Bosworth, C. a et al., 2009. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), pp.4671–6.
- Breitenbach, H.H. et al., 2014. Contrasting Roles of the Apoplastic Aspartyl Protease APOPLASTIC, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1-DEPENDENT1 and LEGUME LECTIN-LIKE PROTEIN1 in Arabidopsis Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology*, 165(2), pp.791–809.
- Bu, Q. et al., 2008. Role of the Arabidopsis thaliana NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Research*, 18(7), pp.756–67.
- Casagrande, S. et al., 2002. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), pp.9745–9.
- Chen, I.-P. et al., 2003. The transcriptional response of Arabidopsis to genotoxic stress - a high-density colony array study (HDCA). *The Plant Journal*, 35(6), pp.771–786.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3), pp.532–4, 536–7.
- Clough, S.J., 2005. Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 286, pp.91–102.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M. & Davies, E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 1385(97).

- Denu, J.M. & Tanner, K.G., 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, 37(16), pp.5633–42.
- Després, C., Chubak, C. & Rochon, A., 2003. Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription. *The Plant Cell*, 15(September), pp.2181–2191.
- Dill, A., Jung, H.S. & Sun, T.P., 2001. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp.14162–7.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D. & Kensler, T.W., 2005. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chemical Research in Toxicology*, 18(12), pp.1779–91.
- Dixon, D. et al., 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, pp.258–266.
- Du, Z. et al., 2010. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), pp.W64–70.
- Ekman, D., Lorenz, W. & Przybyla, A., 2003. SAGE analysis of transcriptome responses in Arabidopsis roots exposed to 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Plant Physiology*, 133, pp.1397–1406.
- Fan, W. & Dong, X., 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 14(June), pp.1377–1389.
- Farmer, E.E. & Davoine, C., 2007. Reactive electrophile species. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp.380–6.
- Feechan, A. et al., 2005. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), pp.8054–9.
- Fields, S. & Song, O., 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), pp.245–6.
- Fode, B. et al., 2008. The Arabidopsis GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *The Plant Cell*, 20(11), pp.3122–35.
- Freedman, R.B. et al., 1998. Experimental and theoretical analyses of the domain architecture of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biological Chemistry*, 379(3), pp.321–8.

- Freedman, R.B., Klappa, P. & Ruddock, L.W., 2002. Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Reports*, 3(2), pp.136–40.
- Fukaki, H. et al., 1998. Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 14(4), pp.425–30.
- Garretón, V. et al., 2002. The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiology*, 130, pp.1516–1526.
- Gietz, R.D. & Woods, R.A., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, pp.87–96.
- Greb, T. et al., 2003. Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development*, 17(9), pp.1175–87.
- Grzam, A. et al., 2007. Gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 581(17), pp.3131–8.
- Gupta, R. & Luan, S., 2003. Redox Control of Protein Tyrosine Phosphatases and Mitogen-Activated Protein Kinases in Plants. *Plant Physiology*, 132, pp.1149–1152.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557–80.
- Hartley, J.L., Temple, G.F. & Brasch, M.A., 2000. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, 10(11), pp.1788–1795.
- Hausladen, a et al., 1996. Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell*, 86(5), pp.719–29.
- Heery, D.M. et al., 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387(6634), pp.733–6.
- Helariutta, Y. et al., 2000. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 101(5), pp.555–67.
- Hess, D.T. et al., 2001. S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nature Cell Biology*, 3(2), pp.E46–9.
- Hu, H. et al., 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), pp.12987–12992.

- Ishii, T. et al., 2006. Mass spectroscopic characterization of protein modification by malondialdehyde. *Chemical Research in Toxicology*, 19(1), pp.122–9.
- James, P., Halladay, J. & Craig, E.A., 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4), pp.1425–36.
- Jensen, M.K. et al., 2007. The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 65(1-2), pp.137–50.
- Jensen, M.K. et al., 2008. Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 56(6), pp.867–80.
- Jeong, J.S. et al., 2010. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology*, 153(1), pp.185–97.
- Kaefer, A. et al., 2009. MarVis: a tool for clustering and visualization of metabolic biomarkers. *BMC Bioinformatics*, 10, p.92.
- Katagiri, F., Seipel, K. & Chua, N., 1992. Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Molecular and Cellular Biology*, 12(11).
- Kim, S.F., Huri, D. a & Snyder, S.H., 2005. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*, 310(5756), pp.1966–70.
- Kim, S.O. et al., 2002. OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell*, 109(3), pp.383–96.
- Koornneef, A. et al., 2008. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology*, 147(3), pp.1358–68.
- Köster, J. et al., 2012. Xenobiotic- and jasmonic acid-inducible signal transduction pathways have become interdependent at the Arabidopsis CYP81D11 promoter. *Plant Physiology*, 159(1), pp.391–402.
- Krawczyk, S. et al., 2002. Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Research*, 30(3), pp.775–81.
- Kuge, S., Jones, N. & Nomoto, a, 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO Journal*, 16(7), pp.1710–20.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.

- Landy, A., 1989. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 58(58), pp.913–949.
- Di Laurenzio, L. et al., 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell*, 86(3), pp.423–33.
- Lee, S. et al., 2002. Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development*, 16(5), pp.646–58.
- Lee, S.-O. et al., 2010. Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation. *The EMBO Journal*, 29(2), pp.363–75.
- Li, L. et al., 2002. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp.5360–8.
- Li, S., Gutsche, N. & Zachgo, S., 2011. The ROXY1 C-terminal L\*\*LL motif is essential for the interaction with TGA transcription factors. *Plant Physiology*, 157(4), pp.2056–68.
- Li, X. et al., 2003. Control of tillering in rice. *Nature*, 422(6932), pp.618–21.
- Lillig, C.H. et al., 2003. Redox regulation of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase from *Escherichia coli* by glutathione and glutaredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(25), pp.22325–30.
- Liu, X. & Lam, E., 1994. Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(1), pp.668–75.
- Ma, Z. et al., 2014. Arabidopsis miR171-Targeted Scarecrow-Like Proteins Bind to GT cis-Elements and Mediate Gibberellin-Regulated Chlorophyll Biosynthesis under Light Conditions. *PLoS Genetics*, 10(8), p.e1004519.
- Martinoia, E. et al., 2001. Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta*, 214(3), pp.345–355.
- Marty, L. et al., 2009. The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(22), pp.9109–14.
- Mateo, A. et al., 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), pp.1795–807.
- Matsui, K., 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current opinion in plant biology*, 9(3), pp.274–80.

- McMillan, B. & Bradfield, C., 2007. The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Molecular Pharmacology*, 72(3), pp.487–498.
- Menezes, R. a et al., 2004. Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions. *FEBS Letters*, 566(1-3), pp.141–6.
- Meng, T.-C., Fukada, T. & Tonks, N.K., 2002. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular Cell*, 9(2), pp.387–99.
- Meyer, Y. et al., 2008. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(4), pp.589–600.
- Miao, Y. et al., 2006. An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell*, 18(10), pp.2749–66.
- Michel, K. et al., 2006. Transcriptional changes in powdery mildew infected wheat and Arabidopsis leaves undergoing syringolin-triggered hypersensitive cell death at infection sites. *Plant Molecular Biology*, 62(4-5), pp.561–78.
- Michelet, L. et al., 2005. Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(45), pp.16478–83.
- Modolo, L. V et al., 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by Arabidopsis thaliana in response to Pseudomonas syringae. *FEBS Letters*, 579(17), pp.3814–20.
- Molinari, M. et al., 2002. Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *The Journal of Cell Biology*, 158(2), pp.247–57.
- Mou, Z., Fan, W. & Dong, X., 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), pp.935–44.
- Mueller, M.J., 2004. Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), pp.441–8.
- Mueller, M.J. & Berger, S., 2009. Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry*, 70(13-14), pp.1511–21.
- Mueller, S. et al., 2008. General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(3), pp.768–85.
- Muthuramalingam, M., Dietz, K.-J. & Ströher, E., 2010. Thiol-Disulfide Redox Proteomics in Plant Research. In R. Sunkar, ed. *Plant Stress Tolerance*. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press.

- Nakajima, K. et al., 2001. Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 413(6853), pp.307–11.
- Nemeth, K. et al., 1998. Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes & Development*, 12(19), pp.3059–3073.
- Nishiyama, T. et al., 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), pp.8007–12.
- Noctor, G., 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment*, 29(3), pp.409–425.
- Olsen, A.N. et al., 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Science*, 10(2), pp.79–87.
- Pandey, S.P. & Somssich, I.E., 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, 150(4), pp.1648–55.
- Parisy, V. et al., 2007. Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(1), pp.159–72.
- Pawloski, J.R., Hess, D.T. & Stamler, J.S., 2001. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*, 409(6820), pp.622–6.
- Peng, J. et al., 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development*, 11(23), pp.3194–3205.
- Pirneskoski, A. et al., 2004. Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(11), pp.10374–81.
- Puranik, S. et al., 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 17(6), pp.369–81.
- Pysh, L.D. et al., 1999. The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal*, 18(1), pp.111–9.
- Qin, X.F. et al., 1994. Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *The Plant Cell*, 6(6), pp.863–74.
- Ramel, F. et al., 2012. Xenobiotic sensing and signalling in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), pp.3999–4014.
- Ratnakaran, N., 2014. “ Identification of the role of Arabidopsis ATAF-type NAC transcription factors in plant stress and development .”

- Remans, T. et al., 2010. Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Functional Plant Biology*, 37(6), p.532.
- Rey, P. et al., 2007. The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfinic acid reductase involved in the photooxidative stress response. *The Plant Journal*
- Richards, D.E., Peng, J. & Harberd, N.P., 2000. Plant GRAS and metazoan STATs: one family? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 22(6), pp.573–7.
- Sabatini, S. et al., 2003. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Development*, 17(3), pp.354–8.
- Sandermann, H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(2), pp.82–4.
- Sandermann, H., Scheel, D. & vdTrenck, T., 1984. Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8(2), pp.167–82.
- Sassa, N. et al., 2001. The molecular characterization and in situ expression pattern of pea SCARECROW gene. *Plant & Cell Physiology*, 42(4), pp.385–94.
- Satoh, T. et al., 2006. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp.768–773.
- Schlaeppli, K. et al., 2008. The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *The Plant Journal*, 55(5), pp.774–86.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), pp.1101–8.
- Schumacher, K. et al., 1999. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHLID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), pp.290–5.
- Schützendübel, A. & Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), pp.1351–65.
- Seo, P.J. et al., 2010. Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 61(4), pp.661–71.
- Sheen, J., 2001. Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 127(4), pp.1466–75.



- Siemsen, T., 2005. *Die Bedeutung des Proteins Scarecrow-like 14 bei der Regulation der Transkription von Stressgenen*
- Silverstone, a L., Ciampaglio, C.N. & Sun, T., 1998. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, 10(2), pp.155–69.
- Silverstone, A.L. et al., 2001. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13(7), pp.1555–66.
- Simon, C. et al., 2014. The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of Arabidopsis to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant, Cell & Environment*, 37(5), pp.1114–29.
- Souer, E. et al., 1996. The no apical meristem gene of Petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85(2), pp.159–70.
- Spadaro, D. et al., 2010. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiologia Plantarum*, 138(4), pp.360–71.
- Spoel, S.H. & Loake, G.J., 2011. Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), pp.358–64.
- Stamler, J.S. et al., 1997. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron*, 18(5), pp.691–6.
- Sun, X., Jones, W.T. & Rikkerink, E.H. a, 2012. GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *The Biochemical Journal*, 442(1), pp.1–12.
- Sung, D.Y., Vierling, E. & Guy, C.L., 2001. Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiology*, 126(2), pp.789–800.
- Tada, Y. et al., 2008. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321(5891), pp.952–6.
- Tian, C. et al., 2004. Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 54(4), pp.519–32.
- Torres, M.A. & Dangl, J.L., 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), pp.397–403.
- Uquillas, C. et al., 2004. NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(1), pp.34–42.

- Vanacker, H., Carver, T.L. & Foyer, C.H., 2000. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, 123(4), pp.1289–300.
- Vollenweider, S. et al., 2000. Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, 24(4), pp.467–76.
- Wang, C. et al., 2012. Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), pp.1139–49.
- Wang, X. et al., 2009. The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(10), pp.1227–38.
- Wang, Y.-Q. et al., 2009. S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(4), pp.2131–7.
- Weber, H. et al., 2004. Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde. *The Plant Journal*, 37(6), pp.877–888.
- Weerapana, E. et al., 2010. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, 468(7325), pp.790–795.
- Weigel, R., Pfitzner, U. & Gatz, C., 2005. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 17(April), pp.1279–1291.
- Welner, D.H. et al., 2012. DNA binding by the plant-specific NAC transcription factors in crystal and solution: a firm link to WRKY and GCM transcription factors. *The Biochemical Journal*, 444(3), pp.395–404.
- Wen, C.-K. & Chang, C., 2002. Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *The Plant Cell*, 14(1), pp.87–100.
- Winger, A.M., Millar, A.H. & Day, D.A., 2005. Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). *The Biochemical Journal*, 387(Pt 3), pp.865–70.
- Wood, M.J., Andrade, E.C. & Storz, G., 2003. The redox domain of the Yap1p transcription factor contains two disulfide bonds. *Biochemistry*, 42(41), pp.11982–91.
- Wysocka-Diller, J.W. et al., 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development*, 127(3), pp.595–603.

- Xie, Q. et al., 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes & Development*, 14(23), pp.3024–3036.
- Xiong, Y. et al., 2009. Characterization of Arabidopsis 6-phosphogluconolactonase T-DNA insertion mutants reveals an essential role for the oxidative section of the plastidic pentose phosphate pathway in plant growth and development. *Plant & Cell Physiology*, 50(7), pp.1277–91.
- Zhang, B. & Singh, K.B., 1994. ocs element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), pp.2507–11.
- Zhang, D., Iyer, L.M. & Aravind, L., 2012. Bacterial GRAS domain proteins throw new light on gibberellic acid response mechanisms. *Bioinformatics*, 28(19), pp.2407–11.
- Zhang, Y. et al., 2003. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 15(11), pp.2647–53.
- Zhou, J.M. et al., 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), pp.191–202.

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A.	
<i>thumefaciens</i>	<i>Agrobacterium thumefaciens</i>
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>as-1</i>	activating sequence 1
BHA	3-t-butyl-4-Hydroxyanisol
<i>bp</i>	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	basischer Leucin-Zipper
C	Cytosin
ca.	circa
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
Da	Dalton
ddNTPs	Didesoxyribonukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTU	Dimethylthiourea
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
et al.	und Andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAL4-AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
H	Histidin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[Ethansulfonsäure]
HSP	Heringssperma-DNA
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
<i>lacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase-Gen
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Met	Methionin
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mPEG-Mal-	Methoxypolyethylen Glycol Maleimid-5000

5000	
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Murashige und Skoog Medium
NLS	Kernlokalisierungssignal
NPR1	NONEXPRESSOR OF PR GENES 1
OD	optische Dichte
oNPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
Poly(A)-	Polyadenyl-
PR	pathogenesis-related
PVDF	Polyvinylidenelektrolyt
R	Widerstand
RES	reaktive elektrophile Spezies
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SCL14	SCARECROW-like 14
SD	Hefe Minimalmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ss	einzelsträngig
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
T	Thymin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
TIBA	2,3,5-Triiodobenzoessäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	definierte Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtprozent

## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all Jenen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, bzw. diese überhaupt erst ermöglicht haben.

An erster Stelle geht mein Dank an Frau Prof. Dr. Christiane Gatz, die mich in Ihre Abteilung aufgenommen und mir damit die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen überhaupt erst gegeben hat. Vielen Dank auch für die vielen Anregungen und konstruktiven Diskussionen im Verlauf dieser Arbeit.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Volker Lipka für viel konstruktive Kritik im Rahmen des Thesis Committees und für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Andrea Polle, Frau Jun. Prof. Cynthia Gleason, Herrn Prof. Dr. Ivo Feussner und Herrn PD Dr. Thomas Teichmann für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Vielen Dank an Dr. Corinna Thurow für die Einführung in die Mysterien der pflanzlichen Molekularbiologie und für die unermüdliche Hilfe und die zahlreichen Anregungen bei methodischen Problemen.

Vielen Dank an Dr. Guido Kriete für die blitzschnelle Hilfe bei jeglichen Problemen technischer Art und für das Organisieren aller großen und kleinen Spielzeuge, die man im Laboralltag so braucht.

Vielen Dank an unsere TAs Anna, Larissa und Ronny für ihre ausgezeichnete handwerkliche Unterstützung und an Anna zusätzlich für die angenehme Atmosphäre in unseren gemeinsamen Laboren in den letzten viereinhalb Jahren.

Vielen Dank an alle Weiteren aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Abteilung für eine Angenehme Atmosphäre im Labor und während der Pausen. Besonderer Dank geht hierbei an Johanna, Martin und Frederik für viele nette Gespräche, gemeinsame Unternehmungen und erlebnisreiche Rollenspielabende.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich auf meinem Weg immer unterstützt und mich in meinen Vorhaben bekräftigt haben. Vielen Dank für so manchen guten Rat, so manchen schönen Augenblick und dafür, dass ich immer weiß dass Ihr für mich da seid, egal ob die Sonne scheint oder die Unwetter mit Macht über mich hereinbrechen.

Ein ebenso besonderer Dank geht an Julia. Danke für die wundervollen letzten drei Jahre und für alle, die ich noch gemeinsam mit Dir erleben darf. Alles ist gut!

# 10 Lebenslauf

## Beruflicher Werdegang

seit 01.2010	Promotion an der Georg August Universität Göttingen, Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze
Dissertationsthema	Transkriptionelle Regulation des pflanzlichen Detoxifikationsprogramms durch das GRAS-Protein SCL14
08. 2009 – 12.2009	Wissenschaftliche Hilfskraft Universität Kassel, Abteilung Biochemie
10.2004 – 07.2009	Studium der Biologie an der Universität Kassel mit Abschluss Diplom
Institut der Diplomarbeit	Institut für Biologie Abteilung Biochemie
Titel der Diplomarbeit	Quantifizierung von cyclischen Nukleotiden <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>
01.2004 – 09.2004	Anstellung als Rettungssanitäter DRK Kreisverband Hameln – Pyrmont
07.2003 – 12.2003	Aushilfe im Rettungsdienst DRK Kreisverband Hameln – Pyrmont

## Zivildienst

09.2002 – 06.2003	Zivildienst mit Ausbildung zum Rettungssanitäter DRK Kreisverband Hameln – Pyrmont
-------------------	--

## Schulische Laufbahn

08.1995 – 06.2002	Besuch des Schiller – Gymnasiums Hameln Abschluss Abitur
08.1993 – 06.1995	Besuch der Orientierungsstufe Hessisch – Oldendorf
08.1989 – 06.1993	Besuch der Grundschule Großenwieden