

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik

Globale Analyse transkriptionaler regulatorischer Netzwerke bei der retrograden Signaltransduktion

Christine Gläßer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H.-W. Mewes

2. Univ.-Prof. Dr. D. Leister

Die Dissertation wurde am 27.11.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.03.2013 angenommen.

Abstract

Plastidial signals serve the coordination of cellular metabolism and adjustment of metabolic demands in dependence on intrinsic and extrinsic stimuli of plants. These retrograde signals have been studied in detail and various pathways have been proposed to contribute to the retrograde signaling cascade. Several triggers of these pathways, namely reactive oxygen species (ROS), cellular redox imbalance, tetrapyrrole intermediates and metabolites, have been suggested. However, a comprehensive analysis elucidating the interplay and hierarchies of these pathways and triggers, their embedding in signaling networks and the identification of the biochemical nature of a putative retrograde signal are still lacking.

In this work, I present a meta-analysis addressing these questions using a transcriptomic approach. In this approach, a signal is indirectly monitored observing the modulated transcriptional response on microarrays. Six biological experiments that each target one of the triggers are discussed. A core response module of plastid-to-nucleus signaling consisting of 39 genes was identified. The core response module contains genes that are responsive to sugar, ROS, abscisic acid and auxin stimuli. These 39 genes are embedded in a complex protein interaction network as indicated by their connection in different protein-protein-interaction (PPI) databases. Lateral modules defined as genes whose expression is modulated in at least three experiments, are characterized for promoter elements, gene ontology (GO) enriched terms, their embedding in signaling and regulatory pathways as well as their connection to PPI networks. Identified promoter elements indicate stimuli that have been suggested by characterization of the putative core response module. Furthermore, the GO enriched terms, pathway analyses and the embedding of those modules in PPI networks point towards nuclear

responses like transcription, translation, defense response and growth related processes as lateral pathways shaping the retrograde signaling cascade.

As indicated by integration of the genes shaping the putative core response module in a complex PPI network, the retrograde signaling network might be of high complexity and tightly connected to general cellular networks. Based on these observations, a model for plastidial signals is suggested. Sugars and ROS, both being emitted in the chloroplast, might be placed at the beginning of plastidial signals. Following up might be ABA signals and auxin signals, possibly leading to the onset of lateral responses like defense response or growth modulation.

Zusammenfassung

Plastidäre Signale dienen der Koordination und Anpassung des zellulären Metabolismus abhängig von intrinsischen und extrinsischen Stimuli in Pflanzen. Eine Reihe retrograder Signale wurde beschrieben und verschiedene Pfade wurden vorgeschlagen, die an der retrograden Signalkaskade teilnehmen. Auch wurden verschiedene Auslöser dieser Pfade, namentlich reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), Störungen des zellulären Redox Haushaltes, Intermediate der Tetrapyrrolbiosynthese und Metabolite, beschrieben. Jedoch fehlt zur Zeit eine globale Analyse, welche das Zusammenspiel dieser Pfade und Auslöser, ihre Einbettung in Signalnetzwerke sowie die biochemische Natur des/der retrograden Signals/e, beschreibt.

In dieser Arbeit stelle ich eine Metaanalyse vor, die sich mit diesen Fragestellungen unter Verwendung von Transkriptomanalysen auseinandersetzt. Diese Vorgehensweise erlaubt die indirekte Beobachtung eines möglichen Signals anhand der transkriptionellen Antworten. In diesem Zusammenhang werden sechs verschiedene Experimente, welche jeweils einen der oben genannten Auslöser modulieren, analysiert.

Aus den Transkriptomdaten wurde ein zentrales Modul aus 39 Genen identifiziert. Die einzelnen Gene werden durch Zucker, ROS, Abszissinsäure und Auxin angesprochen. Diese 39 Gene sind in einem hoch komplexen Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk (PPI-Netzwerk) eingebettet, welches durch die Analyse ihrer Verbindungen in verschiedenen PPI-Datenbanken aufgezeigt wird. Laterale Module, definiert als Gene, die in mindestens drei Experimenten eine modifizierte nukleäre Expression zeigen, werden anhand ihrer Promoterlemente, angereicherter Begriffe in definierten Genontologien (GO), ihrer Einbettung in biologische Pfade und ihrer Verknüpfung in PPI-Netzwerken charakterisiert. Detektierte Promoterelemente weisen auf

Signale hin, welche schon durch die Charakterisierung des zentralen Moduls als mögliche Signale aufgezeigt wurden. Des Weiteren zeigen die angereicherten Terme, Pfadanalysen und die Verknüpfung der lateralen Module in PPI-Netzwerken neben anderen nukleären Antworten Transkription, Translation, Abwehrreaktionen (*defense*) und Prozesse, welche am Wachstum beteiligt sind, als sekundäre Pfade der retrograden Signalkaskade auf.

Die Beobachtung, dass die Gene, welche das Kernantwortmodul ausbilden, in einem komplexen PPI-Netzwerk eingebettet sind, unterstreicht, dass das Netzwerk des retrograden Signals von hoher Komplexität und eng an das allgemeine, zelluläre Netzwerk angeschlossen ist. Basierend auf diesen Beobachtungen stelle ich ein Modell der retrograden Signalkette vor. Zucker und ROS, beide im Chloroplasten entstehend, stehen hierbei möglicherweise am Anfang der plastidären Signale. Nachfolgend sind ABA- und Auxin-Signale, welche eventuell laterale Antworten wie Abwehrreaktionen (*defense*) oder Wachstumsmodulationen beeinflussen.

Danksagung

Während meiner Zeit als Doktorandin wurde ich von sehr vielen Menschen begleitet, die mir mit fachlichem Rat, einem offenem Ohr und einem Schuss Extra-Motivation zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Klaus F.X. Mayer, Gruppenleiter der Bio-GREENformatics beim MIPS, der mich während meiner Promotionsphase unterstützt hat und mir mit Rat zur Seite stand. Ich danke ihm auch sehr für die Möglichkeit, bei Promotions-unabhängigen Projekten Teil haben und dadurch meine Fertigkeiten ausweiten zu können. Auch möchte ich mich bei den Gruppenmitgliedern bedanken, die neben fachlichen Diskussionen auch auf nicht-fachlicher Ebene zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Georg Haberer, der mir während der Schreibphase mit Korrekturen sehr geholfen hat sowie unseren Süß-Admin, der meinen Blutzucker durch verschiedene Schokoladensorten konstant hielt.

Auch bin ich Prof. Dr. H.W. Mewes, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit der Dissertation am Institut für Bioinformatik am Helmholtz-Zentrum sehr dankbar. Ebenso sehr danken möchte ich ihm für Unterstützung und Hilfe während der Promotionsphase selbst.

Diese Arbeit wäre ohne das Zuarbeiten der Kooperationspartner der Forschergruppe FOR804 nicht möglich gewesen. Ich danke daher den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der FOR804 für ihre Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung. Ebenso danke ich Benedikt Wachinger für seine fachliche Unterstützung bei EXCERBT.

Abschließend möchte ich meinen Freunden danken, die mich auch als zeitweise nörgelnder Doktorand ertragen haben und dennoch immer wieder mit mir tanzen, essen oder einfach im Kino waren. Ganz besonders bedanken

möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei meinem Mann Henning, ohne dessen Liebe, Rückhalt, Zuneigung und auch fachlicher Diskussion die Doktorarbeit nicht zu dem geworden wäre, was sie nun ist.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> als Modellorganismus der höheren Pflanzen	1
1.2 Der Chloroplast und plastidäre Signale	4
1.2.1 Tetrapyrrole und ihre Biosynthese	6
1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies	8
1.2.3 Redox-Signale	8
1.2.4 Plastidäre Genexpression	11
1.2.5 Abszissinsäure	11
1.2.6 Zucker-Signale	13
1.3 Microarrays: Grundlage der Transkriptomanalyse	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
1.4.1 Zentrale Fragestellungen	19
1.4.2 Charakterisierung retrograder Signalgebung mithilfe bioinforma- tischer Methoden	20
1.4.3 Zu prüfende Hypothesen	22
2 Ergebnisse	27
2.1 Biologische Experimente	27
2.2 Schnittmengen der biologischen Experimente als Annäherung an Module des retrograden Signals	30
2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale	35

INHALTSVERZEICHNIS

2.3.1	qPCR: Verifizierung der Expression einiger Gene des Kernantwortmoduls	35
2.3.2	Text Mining: literaturbasierte Charakterisierung des Grundmoduls	39
2.3.3	Regulatorische Elemente im Grundmodul	44
2.3.4	Einordnung der im Grundmodul vorherrschenden Hauptsignale Abszissinsäure (<i>abscisic acid</i>) (ABA), Zucker, Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) (ROS) und Auxin	48
2.3.5	Alternatives Spleißen im Grundmodul	52
2.3.6	Einbettung des Grundmoduls in Protein-Protein-Interaktion (PPI)-Netzwerke	54
2.4	Laterale Module	69
2.4.1	Promoterelemente der lateralen Module	70
2.4.2	Charakterisierung lateraler Module anhand von Genontologie (GO)-Anreicherungsanalysen	74
2.4.3	Charakterisierung lateraler Signalpfade und metabolischer Pfade mithilfe verschiedener Datenbanken	77
2.4.4	Einbettung der lateralen Module in PPI-Netzwerke	80
3	Diskussion	87
3.1	Retrograde Signale sind eng an Zucker-, ABA-, Auxin-, ROS- und Calcium-Signale angeschlossen	88
3.2	Retrograde Signale: Beeinflusst durch Licht und alternatives Spleißen?	91
3.3	Laterale Module weisen regulatorische Elemente, die mit ABA, Licht, Abwehrreaktion und Zucker in Verbindung stehen, auf	92
3.4	GO-Anreicherungs- und Pfadanalysen charakterisieren dem Kernantwortmodul angeschlossene laterale Module	93
3.5	Retrograde Signale sind in ein komplexes zelluläres Netzwerk eingebettet	94
3.6	Retrograde Signale bestehen aus verschiedenen Signalen	96
3.7	Werden retrograde Signalkaskaden durch <i>microRNAs</i> (miRNAs) reguliert?	97
3.8	Immunantworten hängen eng mit retrograden Signalen zusammen	98
3.9	Neuere Studien zeigen die Beteiligung von Proteolysevorgängen an retrograden Signalen	99
4	Schlussfolgerung und Ausblick	101

5	Material und Methoden	105
5.1	Biologische Experimente	105
5.1.1	Experiment 1: Tetrapyrrolpfad	105
5.1.2	Experiment 2: Magnesiumchelatase	106
5.1.3	Experiment 3: ROS schützendes Protein (RSP)/Änderung der Lichtqualität	106
5.1.4	Experiment 4: Stärkesynthese und Triosephosphattransport . . .	107
5.1.5	Experiment 5: Redox-Signale	108
5.1.6	Experiment 6: Anpassung der Photosynthese	109
5.2	Microarray Hybridisierung und Datenanalyse	113
5.3	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (qPCR)-Analysen	114
5.4	Auswertung der Microarrays: Normalisierung und differenzielle Expression	116
5.5	Venn Diagramm	116
5.6	GO-Anreicherungsanalyse	117
5.7	<i>kmeans</i> Clustering	117
5.8	Motivsuche	118
5.9	Pfadanalysen	119
5.10	PPI-Netzwerke	119
 Anhang		 121
A Tabellen		121
B Abbildungen		163
C CD		173
 Referenzen		 177
 Erklärung		 189
 Publikationen und Posterpräsentationen		 191
 Lebenslauf		 193

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3
1.2	Darstellung des Elektronenflusses der Photosynthese in der Thylakoidmembran.	5
1.3	Die Tetrapyrrolbiosynthese.	7
1.4	Vermittlung der <i>state transition</i> durch STATE TRANSITION 7 (STN7) und ROS Signalwege.	10
1.5	Die ABA-Synthese.	12
1.6	Hybridisierung eines Affymetrix TM Chips.	18
1.7	Die Arbeitsschritte zur Charakterisierung retrograder Module.	24
1.8	Hypothesen abgeleitet von Pfannschmidt, 2010.	25
1.9	Hypothesen zur Übertragung retrograder Signale nach Leister, 2012.	26
2.1	Übersicht über die verwendeten Experimente.	29
2.2	Darstellung der Schnittmengen der differenziell regulierten Gene in jedem Experiment.	31
2.3	qPCR-Analyse der Gene STP1 (AT1G11260), MEE14 (AT2G15890) und IAA2 (AT3G23030).	36
2.4	qPCR-Analyse der Gene LSU2 (AT5G24660) und ATTPPA (AT5G51460).	37
2.5	qPCR-Analyse der Gene AT1G49230, AT4G28270, HIS1-3 (AT2G18050), AT4G34770, CCL (AT3G26740), IAA29 (AT4G32280), AT3G62950, WRR4 (AT1G56510), LAX3 (AT1G77690), AT5G64640, AT3G15630, DNAJ (AT2G17880) und AT3G44450.	38
2.6	Genomische Position der Grundmodulgene auf den fünf Chromosomen von <i>A.thaliana</i>	41

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.7	Charakterisierung der Gene des retrograden Grundmoduls anhand einer Literaturrecherche.	42
2.8	Verwendete Nummerierung der Schnittmengen des Venn Diagramms.	46
2.9	FIRE Ergebnis des Venn Diagramms.	47
2.10	Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf dem Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-Datensatz sowie den Grundmodulgenen, ihren direkten und indirekten Interaktionspartnern.	58
2.11	Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf ANAP sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern.	60
2.12	Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern, mit STP1.	63
2.13	Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern ohne STP1.	64
2.14	Übereinstimmung der Kategorien der Subnetzwerke und der mit den Netzwerken verknüpften miRNAs basierend auf Y2H-Daten, ANAP und AraNet.	67
2.15	Darstellung der FIRE Ergebnisse für die Gene, welche die laterale Module ausbilden.	73
2.16	Darstellung der Häufigkeit von Kategorien angereicherter GO-Terme in lateralen Modulen.	76
2.17	Darstellung der Häufigkeit einzelner Pfade über die verwendeten Pfadanalyse-Werkzeuge.	78
2.18	Darstellung des Netzwerkes aufbauend auf den Genen der lateralen Modulen sowie ihren direkten Interaktionspartnern, basierend auf dem Y2H-Datensatz	82
2.19	Darstellung des Subnetzwerkes, aufgebaut aus den Genen der lateralen Module sowie ihren direkten Interaktionspartnern, basierend auf EXCERBT	84
2.20	Übereinstimmung der Kategorien der Netzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom und EXCERBT sowie deren assoziierten miRNAs.	85
4.1	Darstellung der hypothetischen Zusammenwirkung verschiedener Signale in der retrograden Signalkette.	104

B.1 Amplifizierte RNA Transkripte der Gene STP1 (AT1G11260), MEE14 (AT2G15890), IAA2 (AT3G23030), LSU2 (AT5G24660) und ATTPPA (AT5G51460) im Rahmen der qPCR-Analyse, durchgeführt von Dr. Lars Dietzel.	163
B.2 Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten und den Grundmodulgenen.	164
B.3 Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf ANAP und den Grundmodulgenen.	165
B.4 Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf AraNet und den Grundmodulgenen.	166
B.5 Gemeinsame Interaktoren der Subnetzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom, ANAP und AraNet.	167
B.6 Darstellung der Auftrennung der Cluster, welche mit dem <i>kmeans</i> -Algorithmus berechnet wurden, anhand der ersten (dc1) und zweiten (dc2) Diskrimantenkoordinate.	168
B.7 Darstellung der FIRE Ergebnisse für die Gene der lateralen Module. . .	169
B.8 Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten und den Genen der lateralen Module.	170
B.9 Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf EXCERBT und den Genen der lateralen Module.	171
B.10 Beispiel für einen Screeplot.	172

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

2.1	Summe der differenziell exprimierten Gene pro Experiment.	32
2.2	Kurzbeschreibung der differenziell exprimierte Gene in allen sechs Experimenten.	33
2.3	GO-Anreicherungsanalyse aller Gene im Grundmodul.	43
2.4	Schnittmenge verschiedener Arrays mit dem Kernantwortmodul.	50
2.5	Alternativ gespleißte Gene in TAIR10.	53
2.6	Grundmodulgene als Zielgene von miRNAs.	55
2.7	Zielgene der in den Netzwerken basierend auf dem Grundmodul vorkommenden miRNAs.	68
2.8	Ähnliche Kategorien zwischen der GO-Anreicherungsanalyse und der Pfadanalyse.	79
5.1	Vergleiche, die in Absprache mit den jeweiligen Kooperationspartnern zwischen Mutante und Wildtyp oder unbehandeltem Wildtyp und behandeltem Wildtyp gezogen wurden.	111
A.1	Verwendete Primer zur Überprüfung der Expression einiger Gene im Kernantwortmodul anhand einer qPCR, durchgeführt von Dr. Lars Dietzel.	122
A.2	Verwendete Primer zur Überprüfung der Expression einiger Gene des Grundmodulmoduls anhand einer qPCR, durchgeführt von Hagen Schlicke	123
A.3	Charakterisierung der Gene im Kernantwortmodul anhand der Literatur.	124
A.4	Regulatorische Elemente im Grundmodul.	129
A.5	CGF1ATCAB2 als Element der Gene des Kernantwortmoduls.	130

TABELLENVERZEICHNIS

A.6 miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf dem Y2H-Datensatz sowie den Grundmodulgenen und ihren indirekten Interaktionspartnern verknüpft sind.	131
A.7 Kategorien, die im Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten sowie den Grundmodulgenen vertreten sind.	132
A.8 miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf ANAP sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern verknüpft sind.	134
A.9 Kategorien, die im Subnetzwerk basierend auf ANAP sowie den Grundmodulgenen vertreten sind.	135
A.10 miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern verknüpft sind.	136
A.11 Kategorien, die im Subnetzwerk basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenen vertreten sind.	137
A.12 Kategorien, die durch GO-Anreicherungsanalyse der einzelnen Gruppen in den Subnetzwerken basierend auf den Grundmodulgenen festgelegt wurden.	139
A.13 Einteilung der Grundmodulgene anhand ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Gruppen in den Subnetzwerken, welche auf den Grundmodulgenen sowie ihren direkten und indirekten Interaktionspartnern basieren. . . .	142
A.14 Regulatorische Elemente in den lateralen Modulen.	146
A.15 Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren in den lateralen Modulen.	148
A.16 Pfade, die durch KEGG Spider, R Spider und PPI Spider in den lateralen Modulen als signifikant befunden wurden.	149
A.17 miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten sowie den lateralen Modulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern verknüpft sind.	153
A.18 Am Subnetzwerk, basierend auf EXCERBT sowie den Genen der lateralen Module und ihren jeweils direkten Interaktionspartnern, beteiligte miRNAs.	154

A.19 Vergleich der Kategorien, die durch GO-Anreicherungsanalyse der einzelnen Gruppen in den Subnetzwerken aufbauend auf dem Y2H Datenset und EXCERBT festgelegt wurden. 155

A.20 Zielgene der in den Netzwerken basierend auf den lateralen Modulen vorkommenden miRNAs. 158

GLOSSAR

2CPA 2-Cys Peroxiredoxin-A

5-ALA 5-Aminolevulinsäure

AAO3 Abszissinaldehyd-Oxidase 3

ABA Abszissinsäure (*abscisic acid*)

ABA2 ABA DEFICIENT 2

Abb. Abbildung

ABI4 ABA-INSENSITIVE 4

ADP Adenosindiphosphat

ADPG ADP-Glucose

AMP Adenosinmonophosphat

AP3 APETALA3

ATHB6 ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 6

ATP Adenosintriphosphat

ATTPA ARABIDOPSIS THALIANA TREHALOSE-6-PHOSPHAT PHOSPHATASE

bp Basenpaare (*base pairs*)

bspw. beispielsweise

bzw. beziehungsweise

ca. circa

CAB CHLOROPHYLL A/B BINDING

CAB2 CHLOROPHYLL A/B BINDING 2

cADPR zyklische ADP-Ribose (*cyclic ADP-ribose*)

CAS CALCIUM-SENSING RECEPTOR

CAX7 CALCIUM EXCHANGER 7

CCL CCR-LIKE

CEO1 CLONE EIGHTY ONE1

CGF1 CHLOROPHYLL A/B BINDING FACTOR 1

CHLD Magnesiumchelatase Untereinheit D

CHLM Methyltransferase S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX

Cy3 Cyanin 3

Cy5 Cyanin 5

cytb6 Cytochrom B6

DIN10 DARK INDUCIBLE 10

DNA Desoxyribonukleinsäure, *deoxyribonucleic acid*

EDS5 ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5

ER Endoplasmatisches Reticulum

EX1 EXECUTER1

EX2 EXECUTER2

EXPA5 EXPANSIN A5

Fd Ferredoxin

f. folgende

ff. fortfolgende

FIRE *Finding Informative Regulatory Elements*

FNR Ferredoxin NADP⁺ Oxidoreduktase

Fru6P Fructose-6-Phosphat

Ftr Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase

GAB Gabaculin

GO Genontologie

GLOSSAR

GSH Glutathion

GUN1 GENOME UNCOUPLED 1

HIS1-3 HISTONE H1-3

Hub Knotenpunkt, Verknüpfungspunkt verschiedener Knoten in einem Netzwerk

IAA2 INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 2

IAA29 INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29

LAX3 LIKE AUX1 3

LBD37 LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 37

LHC Lichtsammelkomplex (*light harvesting complex*)

LHCB *Light harvesting chlorophyll binding*

LHCII Lichtsammelkomplex II (*light harvesting complex II*)

LIMMA *Linear models for microarray data*

LSU2 RESPONSE TO LOW SULFUR 2

MAP Mitogen-aktiviertes Protein

MEE14 MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 14

MgProtoIX Magnesium-Protoporphyrin IX

MgProtoMe Magnesium Protoporphyrin IX Monomethylester

MIAME *Minimum Information About a Microarray Experiment*

MIQE *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

miRNAs *microRNAs*

MoCo Molybdenum Cofactor

mRNA *messenger RNA*

NADP Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NCED 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase

NSY Neoxanthin-Synthase

Pet Photosynthetischer Elektronentransfer

P_i Anorganisches Phosphat

Pheo Pheophytin

PP2C PROTEIN PHOSPHATASE 2C

PPI Protein-Protein-Interaktion

PPR Pentatricopeptid Repeat Protein

PQ Plastoquinon

Psa Photosystem A

Psb Photosystem B

PSI Photosystem I

PSII Photosystem II

qPCR quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative polymerase chain reaction*)

RAP2.4a RELATED TO APETALA 2.4a

RBCS RUBISCO SMALL SUBUNIT

RGA REPRESSOR OF GA1-3

RMA *robust multi-array average expression measure*

RNA Ribonukleinsäure, *ribonucleic acid*

RNAi RNA-Interferenz

RNA-Seq Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung

ROS Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)

rpm Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)

GLOSSAR

RSP ROS schützendes Protein

RRF Redox-ansprechbarer Faktor (*redox responsive factor*)

RuBisCo Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase

s. siehe

SOD Superoxiddismutase

STN7 STATE TRANSITION 7

STN8 STATE TRANSITION 8

STP1 SUGAR TRANSPORTER 1

STT7 STATE TRANSITION 7

SWI/SNF SWITCH/SUCROSE NONFERMENTABLE

T6P Trehalose-6-phosphat

TCH2 TOUCH2

TP Triosephosphat

Trx Thioredoxin

UGE3 UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 3

VDE Violaxanthin-Deepoxidase

vgl. vergleiche

v:v Volumen pro Volumen (*volume to volume*)

WRR4 WHITE RUST RESISTANCE 4

w:w Gewicht pro Gewicht (*weight to weight*)

w:v Gewicht pro Volumen (*weight to volume*)

Y2H Yeast-Two-Hybrid

z.B. zum Beispiel

ZEP Zeaxanthin-Epoxidase

Kapitel 1

Einleitung

1.1 *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus der höheren Pflanzen

Die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (s. Abb. 1.1) hat sich als Modellorganismus fest etabliert. Dazu haben unter anderem ihr kurzer Entwicklungszyklus, ihre gut handhabbare Größe, ihre hohe Nachkommenzahl und ihr vollständig sequenziertes Genom beigetragen [Dean, 1993; Meinke et al., 1998; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000].

Ihr Generationszyklus beträgt unter natürlichen Bedingungen 8 Wochen, unter Laborbedingungen (25 °C, Dauerlicht) durchläuft sie jedoch einen kompletten Entwicklungszyklus innerhalb von 6 Wochen. Da sie mit einer maximalen Größe von 30cm auch recht klein ist, ist es so möglich, auf begrenztem Raum schnell viele Pflanzen anzuziehen. Ihr natürliches Vorkommen liegt auf der nördlichen Halbkugel der alten Welt in gemäßigten Klimazonen, jedoch wurde sie in vielen Regionen als Neophyt eingeschleppt. Dies führte zur Ausprägung von über 750 verschiedenen Ökotypen.

Das Genom von *A. thaliana* wurde im Jahr 2000 vollständig sequenziert [The Arabidopsis Genome Initiative, 2000]. Mit einer Gesamtgenomgröße von 125 Mb, verteilt auf 5 Chromosomen im haploiden Chromosomensatz der diploiden Pflanze, besitzt *A. thaliana* eines der kleinsten Genome der Blütenpflanzen und eines der kleinsten Genome etablierter Modellorganismen. In diesem Genom sind laut der TAIR9 Annotation ca. 33 500

1. EINLEITUNG

repräsentative Genmodelle annotiert (ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Genes/TAIR9_genome_release, 2010), sodass eine sehr hohe Gendichte gegeben ist.

An *A. thaliana* wurden bislang etliche grundlegende Mechanismen aufgedeckt. Die Beschreibung der genetischen Kontrolle der Blütenarchitektur anhand des ABC-Modells [Coen und Meyerowitz, 1991] oder die Beschreibung der Wirkungen des Pflanzenhormons Ethylen [Kieber et al., 1993; An et al., 2010] sind Beispiele dafür. Auch retrograde Signale, welche im Kapitel 1.2 beschrieben werden, wurden an *A. thaliana* untersucht [Larkin et al., 2003; Susek et al., 1993; Kakizaki et al., 2009].

1.1 *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus der höheren Pflanzen



Abbildung 1.1: *Arabidopsis thaliana*. - Skizzenzeichnung von *A. thaliana*. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Michael Bevan.

1.2 Der Chloroplast und plastidäre Signale

Chloroplasten entstanden nach der Endosymbiontentheorie vor ca. 1,3 Milliarden Jahren [Yoon et al., 2004; Gould et al., 2008] durch Aufnahme eines photosynthetisch aktiven Prokaryoten in eine eukaryotische Zelle. Sie nehmen eine zentrale Stelle in der Energieversorgung der Pflanzen ein. Neben der Synthese einiger Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat und Threonin [Kirk und Leech, 1972] findet im Chloroplasten die Photosynthese statt, welche aus anorganischen Stoffen und Licht als Energiequelle die Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) und Stärke herstellt. Ein Effekt der Ausbildung des Chloroplasten als Organell der Grünalgen und höheren Pflanzen war ein lateraler Gentransfer vom Endosymbionten zum Nukleus, der zum Transfer etlicher Gene im plastidären Genom an das Genom des eukaryotischen Nukleus [McFadden, 2001] führte. Nur noch 87 Proteine werden direkt im Chloroplasten kodiert [Sato et al., 1999], sodass der Chloroplast nicht mehr autonom funktionsfähig ist. Die große Mehrzahl der Proteine muss daher in den Chloroplasten importiert werden und enzymatische Komplexe, wie der photosynthetische Apparat [Pfannschmidt, 2003] (vgl. Abb. 1.2), bestehen in der Regel aus einem Mosaik aus kernkodierten und chloroplastidär kodierten Untereinheiten [Kleine et al., 2009]. Der Mangel eines bestimmten Proteinprodukts, der Überfluss eines solchen, die korrekte stöchiometrische Komposition enzymatischer Komplexe oder auch die Koordination metabolischer Flüsse verlangt nach Signalen, die eine enge Koordination der Genexpression zwischen Nukleus und Chloroplast gewährleisten können. Diese Signale werden, liegt ihr Ursprung im Nukleus, als anterograde Signale bezeichnet. Gehen diese Signale vom Chloroplasten aus, werden sie als retrograde Signale bezeichnet. Auch das Mitochondrium, welches eine ähnliche Herkunftsgeschichte wie der Chloroplast aufweist, sendet retrograde Signale [Schwarzländer et al., 2012]; diese liegen jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit.

Retrograde Signale wurden eingehend untersucht und an Expressionsänderungen nukleär kodierter Gene, insbesondere *Light harvesting chlorophyll binding* (LHCB)-Genen, bei bestimmten Stimuli festgemacht. So wurden verschiedene Auslöser und damit verbunden Pfade postuliert [Pfannschmidt, 2010; Kleine et al., 2009; Woodson und Chory, 2008], die im Folgenden näher erläutert werden.

1.2 Der Chloroplast und plastidäre Signale

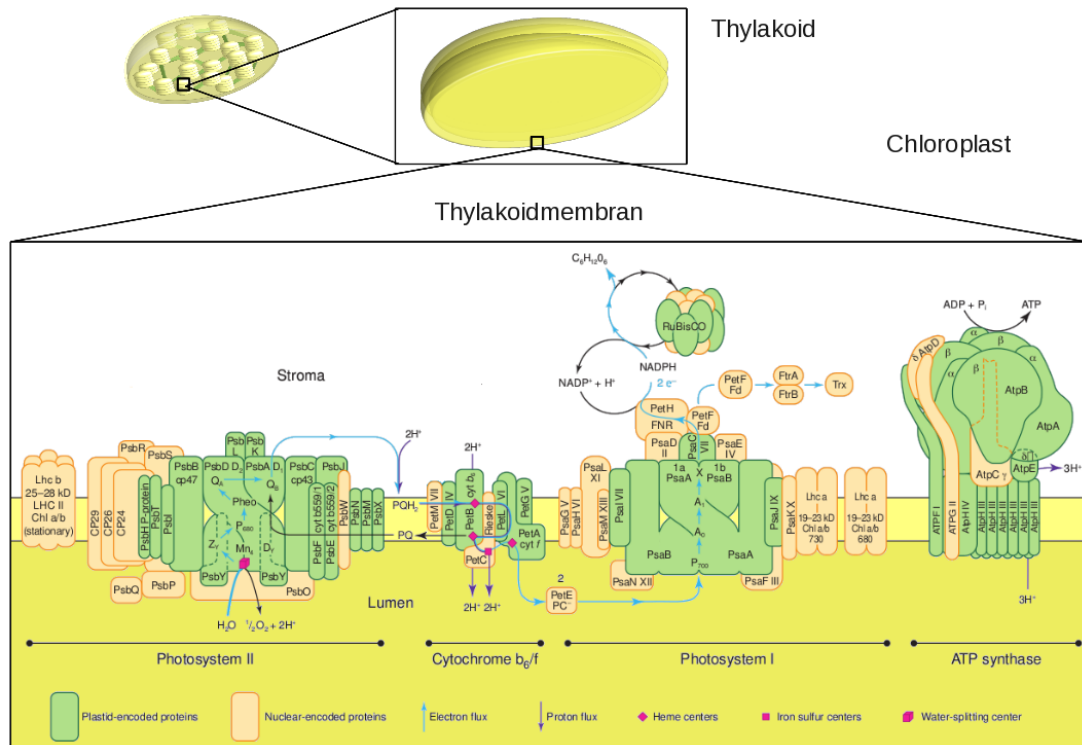


Abbildung 1.2: Darstellung des Elektronenflusses der Photosynthese in der Thylakoidmembran. - Der Photosyntheseapparat, hier beispielhaft an *Spinacia oleracea*, ist ein Mosaik aus plastidär kodierten Proteinen, dargestellt in grün, sowie nukleär kodierter Proteine, dargestellt in orange. Lhc: Lichtsammelkomplex, *light harvesting complex*; ; Psb: Photosystem B; Pheo: Pheophytin; PQ: Plastoquinon; Pet: Photosynthetischer Elektronentransfer; cyt b_6 : Cytochrom B $_6$; Psa: Photosystem A; FNR: Ferredoxin NADP⁺ Oxidoreduktase; NADP: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat; RuBisCo: Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase; Ftr: Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase; Trx: Thioredoxin; ATP: Adenosintriphosphat. Modifiziert nach Race et al., 1999, und mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

1. EINLEITUNG

1.2.1 Tetrapyrrole und ihre Biosynthese

Einer der Mechanismen, der durch retrograde und anterograde Signale gesteuert wird, ist die Chlorophyllbiosynthese (s. Abb. 1.3). Die enge Koordination von nukleärer und chloroplastidärer Expression gewährleistet eine ausreichende Menge an photosynthetisch aktiven Molekülen, während sie andererseits eine Produktion von Zwischenprodukten, welche ungebunden eine phototoxische Wirkung entfalten können, verhindert [Peter und Grimm, 2009]. In diesem Zusammenhang beleuchtete eine der ersten Studien die Rolle der genome uncoupled Mutanten (*gun2-gun5*), welche trotz Inhibition der Carotenoid-Synthese mit Norflurazon die Expression von nukleären LHCB-Reportergenen [Susek et al., 1993; Larkin et al., 2003] und somit eine Entkopplung der LHCB-Expression vom funktionellen Status des Chloroplasten zeigten. In anschließenden Studien konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten im Tetrapyrrol-Pfad lokalisiert sind (vgl. Abb. 1.3). Aus diesem Grund wurde postuliert, dass dieser Pfad an der retrograden Signalkaskade einen wesentlich Anteil hat [Nott et al., 2006]. Auch wurde die Akkumulation von Magnesium-Protoporphyrin IX (MgProtoIX), einem Intermediat der Chlorophyllbiosynthese (vgl. Abb. 1.3), bei Stress-Situationen beobachtet [Alawady und Grimm, 2005; Ankele et al., 2007]. Da diese zu einer Repression der Genexpression nukleär kodierter plastidärer Gene [Strand et al., 2003] führte, wurde somit angenommen, dass MgProtoIX eine Schlüsselrolle beim retrograden Signal spielen könnte. Dieses wurde jedoch durch neuere Studien widerlegt, die eine Entkopplung der Akkumulation von MgProtoIX zur Genexpression nukleär kodierter plastidärer Gene nachwiesen [Moulin et al., 2008; Mochizuki et al., 2008].

1.2 Der Chloroplast und plastidäre Signale

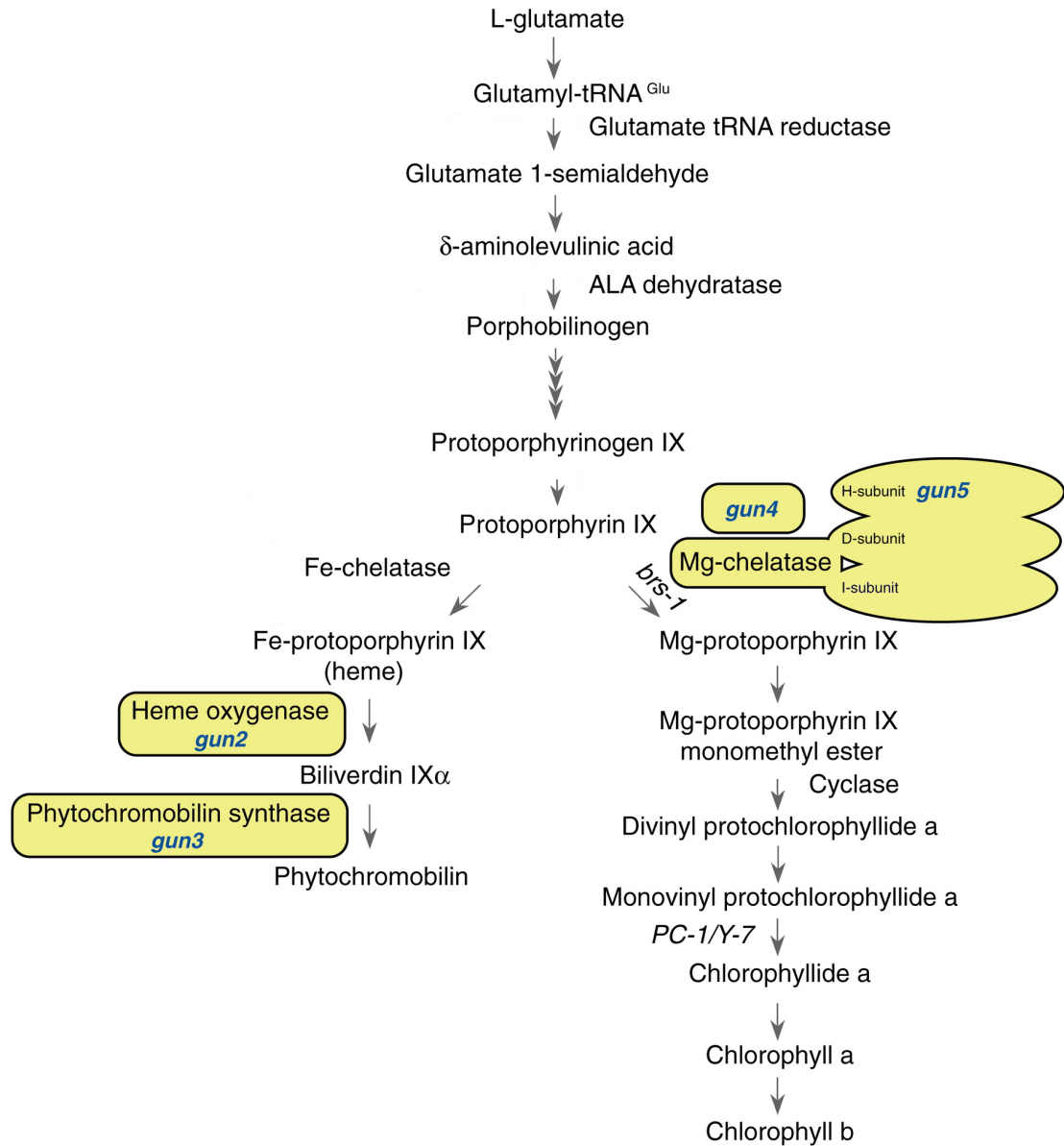


Abbildung 1.3: Die Tetrapyrrolbiosynthese. - Dargestellt sind neben den Syntheseschritten auch die von den *gun*-Mutanten kodierte Enzyme. Nach Nott et al., 2006 und mit freundlicher Genehmigung von *Annual Reviews*.

1. EINLEITUNG

1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$, Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Hydroxyl Radikale $\text{OH}\cdot$ und auch das Superoxid-Anion $\text{O}^{2\cdot-}$, entstehen als Folge eines unausgeglichene Elektronenpools durch starke Lichtintensität bei der Photosynthese und als Nebenprodukt bei etlichen metabolischen Pfaden [Apel und Hirt, 2004]. Im Hinblick auf den Chloroplasten werden drei Stellen unterschieden, die für die Generierung von ROS verantwortlich sind: der Lichtsammelkomplex (*light harvesting complex*) (LHC) im Photosystem II (PSII), das PSII Reaktionszentrum sowie die Photosystem I (PSI) Akzeptorseite [Niyogi, 1999]. ROS bergen ein großes phytotoxisches Potenzial, welches unter anderem zur Photoinhibition durch Oxidation der Proteine im Photosyntheseapparat führen kann und die Photosysteme schädigt [Krieger-Liszkay, 2004]. Neben Schutzmechanismen wie Adaptation des LHC und Adaptation der Elektronentransportkette besitzt der Chloroplast eine Anzahl an Antioxidantien wie Carotenoide, Tocopherole, Ascorbate und Glutathione [Niyogi, 1999]. Auch sind Enzyme bekannt, die ROS reduzieren [McCord und Fridovich, 1969; Noctor und Foyer, 1998; Karpinski et al., 1997]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Singulett-Sauerstoff nicht nur als Toxin agiert, sondern auch als Signalmolekül fungiert und zu einer nukleären Genexpression führt [op den Camp et al., 2003]. In diesem Zusammenhang wurden die plastidären Proteine EXECUTER1 (EX1), EXECUTER2 (EX2) [Lee et al., 2007] sowie CLONE EIGHTY ONE1 (CEO1, [Belles-Boix et al., 2000]) identifiziert, die an diesem ROS-Signalfeld Teil nehmen (vgl. Abb. 1.4). Ihre genaue Funktionsweise ist noch unbeschrieben.

1.2.3 Redox-Signale

Redox-Signale entstehen auf Grund unbalancierter Exzitation des PSI und PSII, welche zu einem unausgeglichene Reduktionsstatus oder auch Redox-Status der photosynthetischen Elektronentransportkette führt und somit eng mit der Generierung von ROS verknüpft ist. Der LHC balanciert den Redox-Status durch eine Kurzzeit- und eine Langzeitantwort. Die Kurzzeitantwort, welche auf post-translationaler Ebene stattfindet, besteht aus der Phosphorylierung des Lichtsammelkomplex II (*light harvesting complex II*) (LHCII) mittels einer Kinase, welche vom PSII zum PSI migriert und

1.2 Der Chloroplast und plastidäre Signale

dadurch mehr Energie zum PSI leitet [Pfannschmidt, 2003]. Diese Antwort auf unausgeglichene Exzitationsenergie findet innerhalb weniger Minuten statt und wird als *state transition* bezeichnet [Allen, 2003]. Die Langzeitanwort hingegen dauert über Stunden und Tage. Hierbei wird die stöchiometrische Summe der beiden Photosysteme auf transkriptioneller Ebene moduliert, um eine Anpassung an veränderte Lichtverhältnisse zu gewährleisten [Pesaresi et al., 2009]. Solch eine Antwort kann jedoch auch durch den Redox-Status des Plastoquinon (PQ) herbeigeführt werden [Pfannschmidt et al., 1999]. Hierbei dient der Redox-Status der Komponenten der Elektronentransportkette als regulierender Parameter, welcher eine Rückkopplungsschleife der Expression photosynthetischer Gene zur Funktion des photosynthetischen Prozesses erlaubt. Die Rolle von Redox-Signalen als distinkte, retrograde Signale wurde erstmals bei der Grünalge *Dunaliella tertiolecta* beschrieben [Escoubas et al., 1995]. Hier wurde gezeigt, dass Redox-Signale zur Regulation von Lichtsammelkomplexgenen, welche im Nukleus kodiert sind, beitragen. Diese Beobachtung konnte auch in *A. thaliana* gemacht werden und bestätigte die distinkte Rolle von Redox-Signalen in der retrograden Signalkaskade [Fey et al., 2005]. Weitere Studien zeigten, dass die Kinase STATE TRANSITION 7 (STT7) in *Chlamydomonas reinhardtii* eine essentielle Rolle bei der *state transition* spielt [Depège et al., 2003]. In *A.thaliana* wurde ein Ortholog identifiziert (STN7, s. Abb. 1.4), das ebenfalls an der *state transition* beteiligt ist und bei mutanten Linien zur Modifikation nukleärer Genexpression führt [Bellafiore et al., 2005; Pesaresi et al., 2009].

1. EINLEITUNG

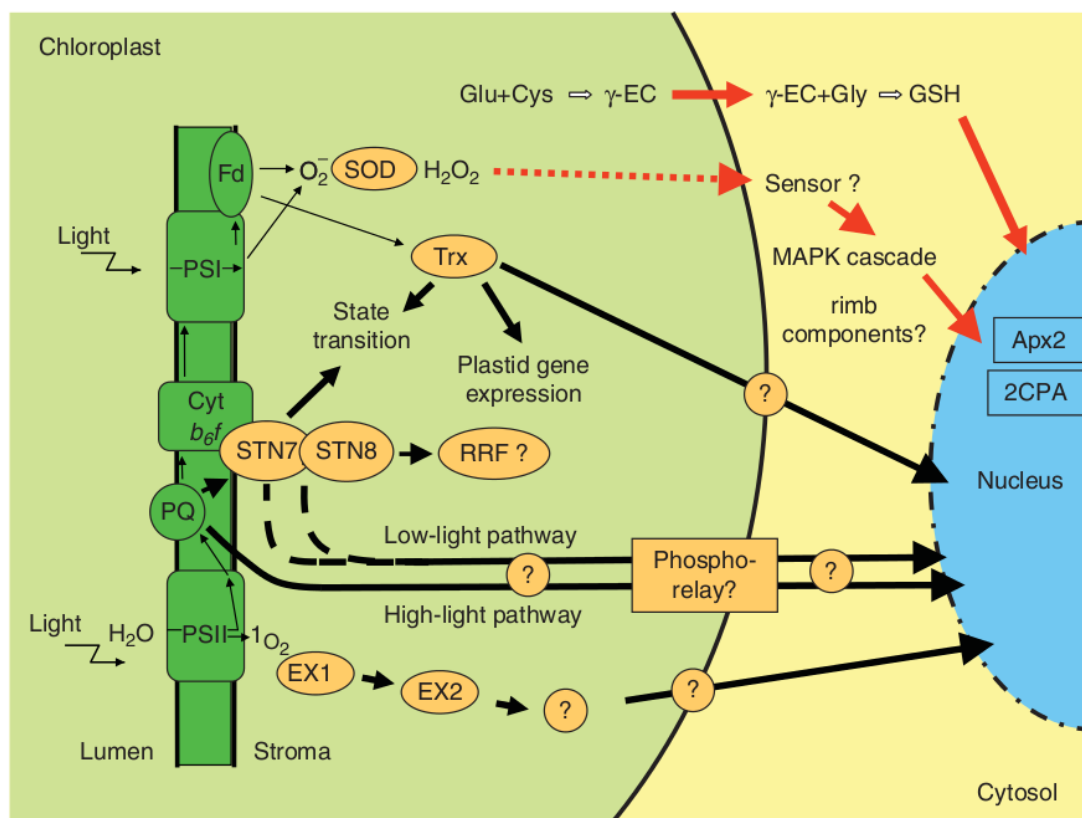


Abbildung 1.4: Vermittlung der *state transition* durch STN7 und ROS-Signalwege. - O₂⁻ entsteht durch Transfer von Elektronen vom PSI oder vom reduzierten Ferredoxin (Fd). Dieses wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu H₂O₂ umgewandelt und kann anschließend zu Wasser reduziert werden. H₂O₂ kann aus dem Chloroplasten diffundieren und stößt möglicherweise einen Signalweg über die Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase Kaskade an. Singulett-Sauerstoff wirkt ebenfalls als Signalmolekül über zwei Komponenten, EX1 und EX2. Elektronen, welche auf Trx übertragen werden, können die Phosphorylierung des LHCII beeinflussen (*state transition*) und dadurch die Genexpression beeinflussen. Auch der Redox Status des PQ führt über die Sensoren STN7 und möglicherweise STN8 zu einer modulierten Genexpression. Inwiefern ein Faktor (Redox-ansprechbarer Faktor, *Redox responsive factor RRF*) involviert ist, der auf Redox-Signale aus dem Plastoquinonpool antwortet, ist noch unklar. Der Signalweg könnte mit einer Phosphorylierungskaskade in Verbindung stehen. Ungeklärte Zwischenschritte sind mit einem Fragezeichen markiert. Rote Pfeile stehen für Redox-Signale von Komponenten, welche den Chloroplast direkt verlassen; schwarze, dicke Pfeile für Redox-Signale, die über unbekannte Komponenten vermittelt werden; schwarze, dünne Pfeile für den Elektronenfluss. Proteine sind in orange dargestellt. Nach Pfannschmidt et al., 2009, und mit freundlicher Genehmigung von *Oxford University Press*.

1.2.4 Plastidäre Genexpression

Mithilfe verschiedener Antibiotika wie z.B. Chloramphenicol oder Lincomycin kann spezifisch die plastidäre Translation unterdrückt werden [Oelmüller et al., 1986; Gray et al., 1995]. In einem frühen Entwicklungsstadium, 48-72 Stunden nach Keimung, führt diese Unterdrückung zu einem retrograden Signal, das die Expression von nukleär kodierten Photosynthese-Genen unterdrückt [Gray et al., 1995]. In diesem Zusammenhang wurde die Mutante *gun1* identifiziert, die gegenüber einer Lincomycin-Behandlung insensitiv und weiter in der Lage ist, die Expression von Photosynthese-Genen aufrecht zu erhalten [Gray et al., 2003]. Obwohl sie erstmals mit den *gun*-Mutanten beschrieben wurde, die eine Rolle im Tetrapyrrolpfad spielen [Susek et al., 1993], konnte gezeigt werden, dass das Pentatricopeptid Repeat Protein (PPR) GENOME UNCOUPLED 1 (GUN1) einen möglichen Hauptschalter oder *Masterswitch* darstellt, der mutmaßlich Signale aus der Tetrapyrrolbiosynthese, Redox-Signale sowie Signale der plastidären Genexpression integriert [Koussevitzky et al., 2007]. Die genaue Funktionsweise von GUN1 ist jedoch noch unbekannt.

1.2.5 Abszissinsäure

ABA (Abszissinsäure, *abscissic acid*) ist ein Phytohormon, welches bei verschiedenen Stress-Situationen wie Wasserstress [Zeevaart und Creelman, 1988; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993] oder Salzstress [Zhang et al., 2006] sowie bei der Regulation des Wachstums [Finkelstein et al., 2002] und der Regulation der Stomata-Öffnung [Pei et al., 2000] eine essentielle Rolle spielt. Doch auch bei retrograden Signalen spielt ABA möglicherweise eine Rolle. So wurde beobachtet, dass ABA die nukleär kodierten Gene für CHLOROPHYLL A/B BINDING (CAB) und RUBISCO SMALL SUBUNIT (RBCS) negativ reguliert [Bartholomew et al., 1991] sowie Redox-Regulation von 2-Cys Peroxiredoxin-A (2CPA), einem chloroplastidären Antioxidationsenzym, beeinflusst [Baier et al., 2004]. Des Weiteren zeigen viele kernkodierte chloroplastidäre Proteine ABA-regulatorische Motive [Weatherwax et al., 1996; Rodriguez Milla et al., 2003]. Eine mögliche Verknüpfung von ABA mit retrograden Signalen ist über die Synthese von ABA-Vorläufern im Chloroplasten gegeben (vgl. Abb. 1.5).

1. EINLEITUNG

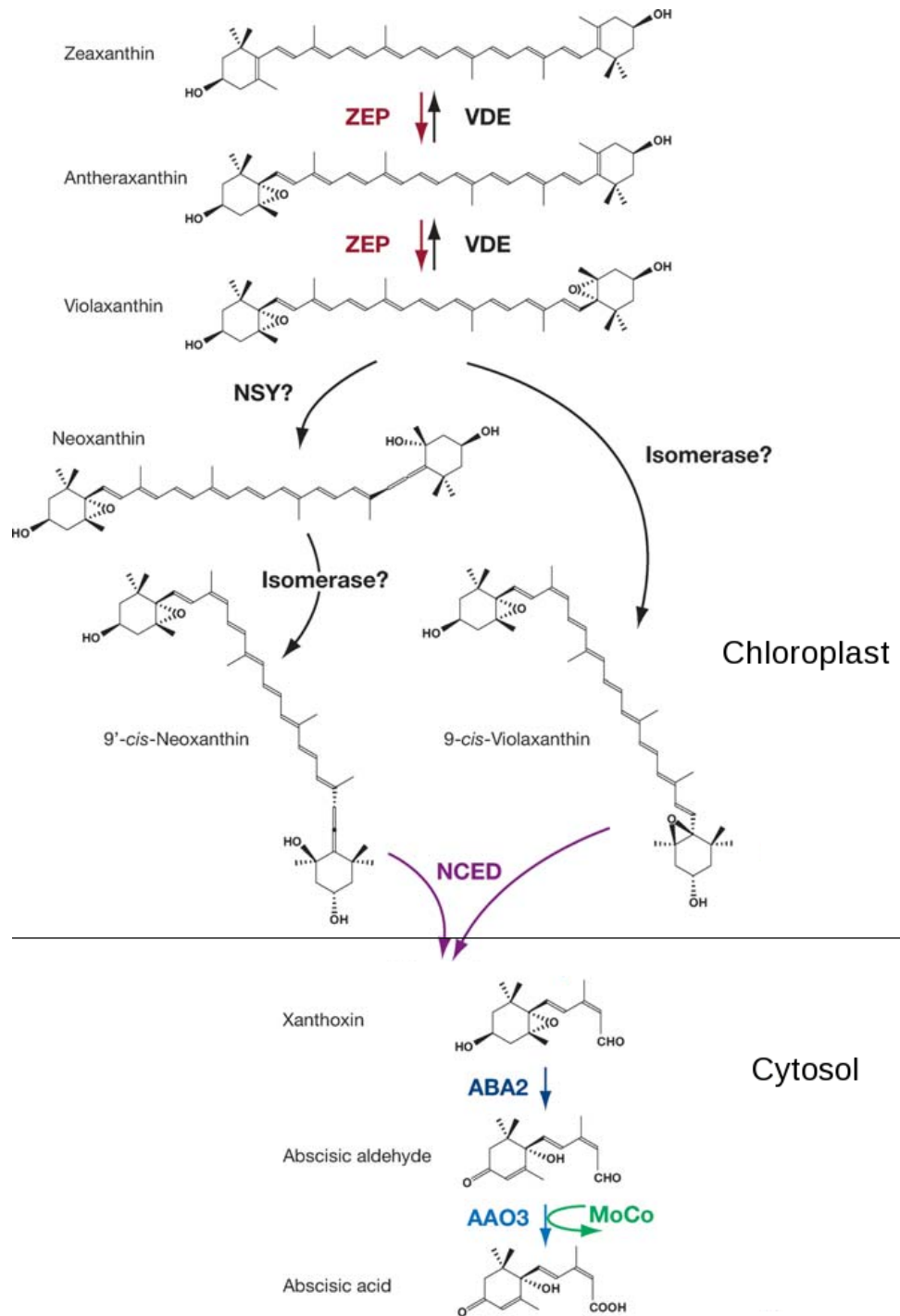


Abbildung 1.5: Die ABA-Synthese. - Vorstufen von ABA werden im Chloroplasten gebildet, während die Endsynthese im Cytosol statt findet. ZEP: Zeaxanthin-Epoxidase; VDE: Violaxanthin-Deepoxidase; NSY: Neoxanthin-Synthase; NCED: 9-cis-Epoxycarotenoid-Dioxygenase; ABA2: ABA DEFICIENT 2, Alkohol-Dehydrogenase; AAO3: Abszissinaldehyd-Oxidase 3; MoCo: Molybdenum Cofactor. Nach Nambara und Marion-Poll, 2005, und mit freundlicher Genehmigung von *Annual Reviews*.

1.2.6 Zucker-Signale

Über die Rolle von Metaboliten wie Zucker bei plastidären Signalen ist zur Zeit noch recht wenig bekannt. Einige Indizien sprechen jedoch dafür, dass Zucker-Signale an retrograden Signalen beteiligt sind. So reprimiert eine erhöhte Zuckerkonzentration die Expression von nukleären Photosynthesegenen [Zhang et al., 2010] und eine Mutante eines Triosephosphat/Phosphat Translokator, welcher an der inneren chloroplastidären Membran sitzt, führt zu einer Veränderung der Photosyntheserate [Walters et al., 2003]. Auch wurden Interaktionspartner von HEXOKINASE 1, die einen Hauptsensor der Zucker-Signale darstellt und auch im Chloroplasten auftritt [Olsson et al., 2003], im Nukleus gefunden [Cho et al., 2006] und könnten so eine mögliche Signalübertragung von retrograden Zucker-Signalen zum Nukleus ermöglichen.

1.3 Microarrays: Grundlage der Transkriptomanalyse

Ein Microarray ist eine Matrix aus Sequenzen mehrerer tausend Gene auf einer festen Unterlage, welche die parallele Analyse der Expressionsstärke dieser Gene ermöglicht. Die Technologie beruht auf komplementärer Bindung von RNA- oder DNA-Molekülen an ihren DNA-Gegenpart. Eine der ersten erfolgreichen Anwendungen des Microarrays auf eine genomweite Transkriptomanalyse, einer Analyse der Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribierten Gene, wurde in *A. thaliana* gezeigt [Scheina et al., 1995]. Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Microarrays, sogenannte *spotted microarrays* und *Oligonukleotid-Arrays*. Beim ersten Typ, den *spotted microarrays*, werden die synthetisierten, einsträngigen DNA-Proben als Ganzes auf der festen Unterlage kovalent gebunden. Bei den *Oligonukleotid-Arrays* werden die zu untersuchenden Sequenzen direkt auf dem Array durch Photolithographie synthetisiert. Das Endprodukt ist bei beiden Herstellungsarten ein Chip, auf dem einsträngige DNA-Sequenzen, die Reporter, gebunden sind. Für die anschließende Hybridisierung der Reporter wird aus dem zu untersuchenden Gewebe RNA isoliert, in cDNAs oder cRNA übersetzt und für die Hybridisierungslösung aufbereitet. Anschließend erfolgt die Fluoreszenzmarkierung. Bei einfarbigen (*one-channel*) Microarrays werden die Proben dabei nur mit einem Farbstoff markiert, bei zweifarbigen (*two-channel*) mit unterschiedlichen Farbstoffen. Dabei greift man meist auf Cyanin 3 (Cy3) (Emissionsmaximum 570 nm, grün) und Cyanin 5 (Cy5) (Emissionsmaximum 670 nm, rot) zurück. Ein Beispiel für einen einfarbigen Microarray sind Chips der Firma AffymetrixTM, während die Firma AgilentTM auch zweifarbige Chips herstellt. Anschließend wird die Fluoreszenzstärke mithilfe spezieller Laser gemessen. Je mehr eines Transkripts in der Probe vorhanden war, desto intensiver wird die Fluoreszenzstärke bis hin zur maximalen Sättigung auf dem gebundenen Reporter, sodass Rückschlüsse auf die Transkriptionsstärke gezogen werden können. Während bei einfarbigen Microarrays nur die Transkripte jeweils einer Versuchsbedingung betrachtet werden können, erlauben zweifarbige Microarrays die gleichzeitige Betrachtung zweier Bedingungen. Ein klassisches Beispiel ist die Untersuchung der Transkriptionsaktivität einer Tumorzelle gegenüber einer gesunden Zelle; hierbei wird das Transkriptom der beiden Zellen unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und beide Proben auf dem Array aufgebracht, sodass durch das Verhältnis der beiden

1.3 Microarrays: Grundlage der Transkriptomanalyse

verwendeten Farbstoffe zueinander eine differenzielle Regulation der Gene in beiden Proben aufgezeigt werden kann.

Bei der nachfolgenden Analyse erfolgt die Normalisierung der Daten mithilfe sogenannter *spike-ins*. Dabei handelt es sich zumeist um RNA-Proben, die vom Hersteller stammen und bei der Probenaufbereitung des zu untersuchenden Gewebes in einer bekannten Menge zugefügt werden. Diese binden an eine spezifische Kontrollprobe und erlauben durch Messung ihrer Bindungsstärke an die Kontrolle eine Normalisierung der Proben-RNA. Sind die Daten eines Microarrays vorhanden, so folgt nun die bioinformatische Analyse.

Die Hintergrundkorrektur stellt den ersten Verarbeitungsschritt dar. Die Fluoreszenzmarkierung einzelner Spots sowie des Hintergrunds unterliegt unterschiedlichen Schwankungen, beispielsweise ungleichmäßiger Färbung der Bereiche eines Microarrays, sodass diese Effekte durch geeignete Methoden der Hintergrundkorrektur (vgl. 5.4) minimiert werden und die Signale der Spots auf die Signale des sie umgebenden Hintergrunds bezieht. Die einfachste Methode subtrahiert hierbei das Hintergrundsignal von der Signalstärke des jeweiligen Spots. Der anschließende Verarbeitungsschritt betrifft die Normalisierung, welche die jeweilige Signalintensität zwischen den Spots eines Arrays ausgleicht. Die Grundannahmen der einfachsten Normalisierungsmethode, der sogenannten Totalen Intensitätsnormalisierung [Quackenbush, 2002], sind zum einen gleichmäßig verwendete RNA-Mengen pro Array und als Konsequenz gleiche Massen eines bestimmten RNA-Moleküls. Des Weiteren wird angenommen, dass ein Array ein randomisiertes Set an Genen aufweist. Würden nur solche Gene betrachtet, bei denen eine Expressionsänderung erwartet wird, so würden bestimmte Gene über- oder unterrepräsentiert zwischen verschiedenen Arrays sein [Quackenbush, 2002]. Ist dies jedoch nicht der Fall, so wird bei den Arrays eine bestimmte RNA-Spezies mehr als eine andere gebunden sein, jedoch wird sich die Gesamtmenge an gebundener RNA zwischen den Arrays nicht unterscheiden. Die Gesamtintensität der Hybridisierung aller Spots auf einem Array wären somit annähernd gleich und es ließe sich ein Normalisierungsfaktor berechnen [Quackenbush, 2002]:

$$N_{total} = \frac{\sum_{i=1}^{N_{array}} R_i}{\sum_{i=1}^{N_{array}} G_i} \quad (1.1)$$

1. EINLEITUNG

mit G_i und R_i als Intensitäten des i -ten Elements der zu vergleichenden Arrays G und R sowie N_{array} als Gesamtheit aller auf dem Array repräsentierten Spots. Sind nun beide oder nur eine Intensität bereits skaliert, so wird jede normalisierte Expressionsrate jedes Spots auf dem Array gemäß :

$$T_i = \frac{R_i}{G_i} = \frac{1}{N_{total}} \frac{R_i}{G_i} \quad (1.2)$$

mit T_i als Expressionsverhältnis des Genes i zwischen den Arrays so bestimmt, dass das mittlere Verhältnis gleich 1 ist. Neben dieser Methode mit einfachen Grundannahmen existiert eine Vielzahl an Normalisierungsmethoden, die von diesen Grundannahmen abweichen [Irizarry et al., 2003; Tseng et al., 2001; Chen et al., 1997]. Somit weisen zu vergleichende Arrays statistisch betrachtet die selbe Dichteverteilung auf. Dadurch ist es möglich, Unterschiede in den Arrays auf Grund der Experimente und der Handhabung bei der Hybridisierung zu minimalisieren. Bei zweifarbigen Microarrays wird zusätzlich über die Kanäle normalisiert, um unterschiedlichen Bindungsaffinität der unterschiedlichen Farbstoffe Rechnung zu tragen. Nun können die einzelnen Gene in ihrer Intensität miteinander verglichen werden.

Bei einfarbigen AffymetrixTM-Chips kann das Programm *Linear models for microarray data* (LIMMA) [Smyth, 2004] verwendet werden (vgl. 5.4). Dabei wird ein lineares Modell an jedes Gen angepasst und anschließend der Vergleich zwischen zwei Genen auf unterschiedlichen Microarrays gezogen. Hierbei ist ein Microarray oder eine Gruppe von Microarrays die Referenz, die übrigen die Testgrößen. Pro Gen wird so der sogenannte logarithmische *Foldchange*, d.h. die logarithmische Änderung der Expressionsstärke eines Gens gegenüber der Referenzgröße, ermittelt und mithilfe eines t-Tests die Signifikanz dessen geprüft. Auch bei zweifarbigen Chips kann LIMMA herangezogen werden. Eine Übersicht über den Ablauf eines Hybridisierungsexperiments, beispielhaft an einem AffymetrixTM Chip, ist in Abb. 1.6 dargestellt.

Der Vorteil der Microarrays liegt in der schnellen Analyse kompletter Transkriptome. Jedoch können Ergebnisse auf Grund Kreuz-Hybridisierung der Proben verfälscht werden. Ein weiterer Schwachpunkt der Microarray-Technologie ergibt sich durch die Nutzung verschiedener Plattformen, die einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben können [Järvinen et al., 2004]. Ebenso spielt die technische Variabilität eines Arrays eine Rolle. So können Spots, die vervielfältigt auf einem Array für das gleiche

1.3 Microarrays: Grundlage der Transkriptomanalyse

Gen aufgebracht sind, unterschiedlich stark gebunden werden. Zwar erhöht diese Vorgehensweise die Genauigkeit der Messungen, jedoch wird in der Auswertung der mittlere Wert aller Spots eines Genes betrachtet, sodass hier Ungenauigkeiten auftreten können. Auch die biologische Variabilität der Proben kann zu Unterschieden in der Auswertung der Microarrays führen, ebenso die Verwendung biologischer Replikate. Hierbei handelt es sich um Proben verschiedener Zellen, die zwar den selben biologischen Hintergrund aufweisen, jedoch nicht exakt identisch sind. Die Expression eines Genes wird, ebenso wie die Expression der vervielfältigten Spots auf dem Array selbst, über alle Replikate gemittelt. Auch hier können Schwankungen auftreten, die durch Verwendung mehrerer biologischer Replikate vermindert werden können. Ein weiterer Schwachpunkt ist die Hybridisierung selbst, die laborabhängigen Einflüssen ausgesetzt ist.

Um diese Unterschiede zu minimieren, wurden Richtlinien zusammengetragen, die ein Microarray-Experiment erfüllen muss und als *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) [Brazma et al., 2001] bekannt sind. Diese sollen die Austauschbarkeit der Arrays zwischen verschiedenen Laboren erleichtern.

1. EINLEITUNG

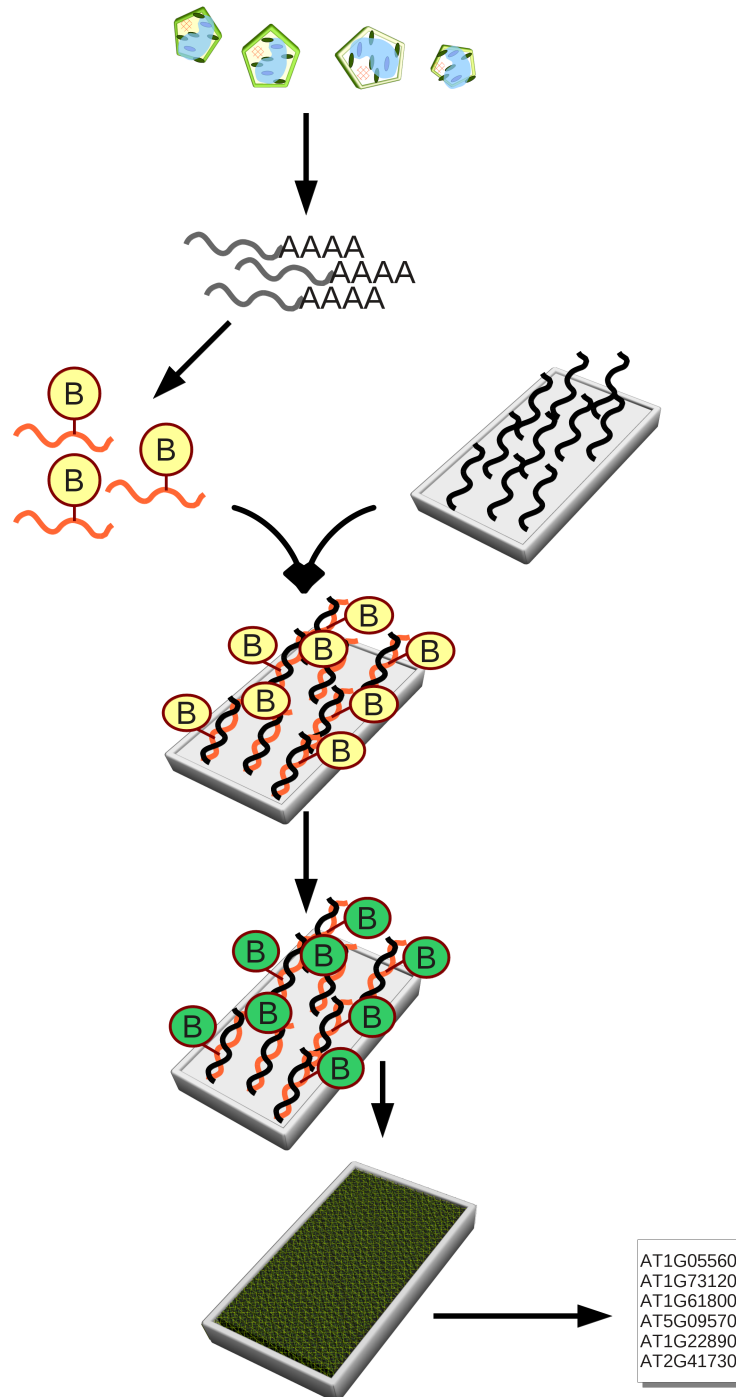


Abbildung 1.6: Hybridisierung eines Affymetrix™ Chips. - Aus dem zellulären Material wird *messenger RNA* (mRNA) extrahiert, diese anschließend mit Biotin markiert und mit den Reportersequenzen auf dem Chip hybridisiert. Nach Waschung und Färbung, üblicherweise mit dem Farbstoff Cy3, werden die Chips gescannt und eine Abbildung der Fluoreszenzstärken erstellt [Sassolas et al., 2008]. Die anschließende Auswertung erfolgt mithilfe spezieller Programme wie z.B. LIMMA, sodass ein Vergleich auf transkriptioneller Ebene zwischen verschiedenen Arrays gezogen werden kann.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

1.4.1 Zentrale Fragestellungen

Zwar weiß man, dass die in 1.2 ff. vorgestellten Signale und physiologischen Änderungen des Zustands des Chloroplasten retrograde Signale auslösen, jedoch ist unklar, in welcher Hierarchie sie zueinander stehen. Der Zusammenhang dieser Signale zu retrograden Signalen ist, obwohl gezeigt werden konnte, dass jedes eine Expressionsänderung nukleär kodierter chloroplastidärer Gene auslöst, weiterhin unklar. Die Definition eines retrograden Signals anhand eines Phänotyps von Pflanzen, die eine Störung im retrograden Signal aufweisen, erweist sich ebenso als schwierig. Beispielsweise zeigen Pflanzen, die mit Norflurazon behandelt wurden und in Folge eine Ausbleichung der Chloroplasten mit gestörter nukleärer Genexpression aufweisen, einen starken Phänotyp. Da jedoch der Chloroplast durch Oxidation zerstört wurde, muss dieser Phänotyp nicht zwangsweise mit gestörten retrograden Signalen in Verbindung stehen, sondern könnte auch eine Reaktion auf den defekten Energielieferanten der Zelle sein. Ein anderes Beispiel ist die Mutation der STN7-Kinase, die eine entscheidende Rolle bei der Übermittlung von retrograden Redox-Signalen spielt. Pflanzen mit dieser Mutation weisen keinen sichtbaren Phänotyp auf [Pesaresi et al., 2009].

Ebenso unklar ist, ob es sich um ein oder mehrere retrograde Signale handelt, die im Zusammenspiel eine Änderung des Zustandes des Chloroplasten an den Nukleus übermitteln. Da jedoch verschiedene Signale und Zustandsänderungen des Chloroplasten an ein retrogrades Signal gekoppelt sein können (vgl. 1.2 ff.), ist es möglich, dass mehrere spezifische retrograde Signale existieren. Ein Beispiel ist die Norflurazon-Behandlung, welche die Carotenoidsynthese (vgl. 1.2.1) inhibiert. Diese inhibiert die Expression photosynthetischer Gene im Nukleus, weshalb sie für die Identifizierung von Mutanten herangezogen wurde, die Defekte in der retrograden Signalgebung aufwiesen [Nott et al., 2006]. Bei der Norflurazon-Behandlung interferieren drei Signalwege: Tetrapyrrol-Signale, da die Carotenoidsynthese gestört ist, ABA-Signale, da ABA Intermediate aus dem Tetrapyrrolweg generiert werden, und ROS-Signale, die bei der Oxidation und darauf folgender Zerstörung des Chloroplasten eine Rolle spielen [Chamovitz et al., 1991; Pfannschmidt, 2010]. Es wäre somit möglich, dass retrograde Signale nicht als einzelne, distinkte Signale auftreten, sondern in ihrer Summe als ein

1. EINLEITUNG

Signal interpretiert werden. Einzelne Module plastidärer Signalgebung sowie deren Interaktionen sind folglich ebenso unbekannt, auch deren Regulation über spezifische *cis*-Elemente. Zwar wurde die CUF-1 Box als regulatorisches Element bei der retrograden Signalgebung postuliert [Strand et al., 2003], konnte jedoch nur in wenigen nukleär kodierten photosynthetischen Genen nachgewiesen werden. Die Einbettung retrograder Signale in metabolische Netzwerke der Pflanzenzelle ist bisher ebenso ungeklärt. Damit verbunden ist des Weiteren die Unkenntnis über die Einbindung retrograder Signale in Signalnetzwerke. Bisherige Studien betrachteten retrograde Signale nur anhand eines Signalpfades, jedoch nicht auf einer globalen Ebene, sodass der Zusammenhang zwischen retrograden Signalen und dem allgemeinem Signalnetzwerk nicht aufgezeigt werden konnte. Auch die biochemische Natur der Signale wurde noch nicht hinreichend untersucht.

Um diesen Unzulänglichkeiten zu begegnen, wurde die Forschergruppe FOR804 gegründet. Mehrere biologische Arbeitsgruppen untersuchten hierbei verschiedene Teilaspekte retrograder Signale in *A.thaliana* und ermöglichten eine globale, bioinformatische Analyse durch die Bereitstellung geeigneter Microarrays.

1.4.2 Charakterisierung retrograder Signalgebung mithilfe bioinformatischer Methoden

Die Transkriptomanalyse anhand der Arrays lässt gezielte Vergleiche zwischen Mutanten, die eine Störung des retrograden Signals zeigen, oder Behandlungen an Wildtyppflanzen, die ebenfalls eine Störung oder Veränderung im retrograden Signal auslösen, und unbehandelten Wildtyppflanzen zu und dient als Basis weiterer Analysen. Durch diese Vergleiche können plastidäre Signale und Signalwege indirekt über veränderte Transkription bestimmter Gene beobachtet und charakterisiert werden. Die Signale können nicht direkt beobachtet werden, da Transkriptomanalysen nur die Expression einzelner Gene, nicht aber mutmaßliche Signale, abbilden. Das Ziel der globalen Analyse ist die Einordnung der verschiedenen Pfade und Auslöser sowie die Aufdeckung möglicher zentraler Module des retrograden Signals und ihrer Charakterisierung. Als Kernantwortmodul oder Grundmodul werden im Folgenden alle Gene, die bei allen Experimenten differenziell exprimiert sind, bezeichnet. Auch diesem angeschlossene Module, die im Folgenden als laterale Module bezeichnet werden, sollen beschrieben werden.

Sie zeichnen sich durch Gene aus, die in mindestens drei Experimenten differenziell exprimiert werden. Die Charakterisierung dieser Module wird auf globaler Ebene durch verschiedene Methoden erreicht.

Die Funktionalität der Gene, welche die jeweiligen Module aufbauen, kann mithilfe einer Genontologie (GO) -Anreicherungsanalyse [Ashburner et al., 2000] beschrieben werden. Genontologien beschreiben die Eigenschaften eines Genprodukts anhand seiner molekularen Funktion, dessen Beteiligung an biologischen Prozessen und seiner zellulären Lokalisation mit speziesneutralen Termen. Eine Anreicherungsanalyse beschreibt, welche dieser Terme in einer Teilmenge an Genen gegenüber eines definierten Genraums, z.B. dem kompletten Transkriptom auf dem Microarray, gehäuft auftreten. Anhand dieser angereicherten Terme kann auf die Funktionalität der Module geschlossen werden, ebenso auf Signale, welche die beteiligten Gene induzieren können. Eine Analyse auf *cis*-Elemente, die den Genen der verschiedenen Modulen gemein sind, erweitert die funktionelle Beschreibung der Module um deren regulatorische Aspekte. Die Identifikation solcher Elemente beleuchtet regulatorische Mechanismen der Module durch Identifikation sequenzspezifischer Steuerungselemente der jeweiligen Gene. Sowohl die GO-Anreicherungs- als auch die *cis*-Elementanalyse fokussieren auf die transkriptionelle Ebene. Die Betrachtung der Einbettung der Module in verschiedene Netzwerke fügen den bioinformatischen Analysen Facetten der Integration retrograder Signalgebung in das allgemeine, cytosolische Signal- und metabolische Netzwerk hinzu und erweitert den Fokus der Analysen hin zu einer systembiologischen Ebene. Hierbei lassen Pfadanalysen, die auf die Eingliederung der Genprodukte der Module in metabolische und signalverarbeitende Pfade abzielen, Rückschlüsse auf die Verzahnung der Module mit dem zellulären Metabolismus und zellulären Signalpfaden zu. Die Verknüpfung der Proteinprodukte der Gene, welche die Module aufbauen, in Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken (PPI-Netzwerke) runden die Analysen ab. Die Charakterisierung resultierender Verknüpfungsgruppen, basierend auf GO- Anreicherungsanalysen, lässt in diesem Ansatz die Beschreibung der Art der funktionellen Einbettung der Module in cytosolische Netzwerke zu. Auch können Rückschlüsse auf die Stärke der Integration der einzelnen Module gezogen werden. Bilden beispielsweise Proteinprodukte der Gene eines Moduls ein recht geschlossenes Modul, sowohl funktionell als auch topologisch, so kann man schlussfolgern, dass dieses Modul schwach in allgemeine, cytosolische Netzwerke integriert ist. Sind die Proteinprodukte jedoch stark über

1. EINLEITUNG

funktionelle Gruppen gestreut oder stark in unterschiedliche Verknüpfungsgruppen integriert, so kann geschlussfolgert werden, dass das betreffende Modul stark in allgemeine zelluläre Netzwerke integriert ist.

Eine Übersicht über die Arbeitsschritte ist in Abb. 1.7 dargestellt.

1.4.3 Zu prüfende Hypothesen

Verschiedene Hypothesen können anschließend betrachtet werden [Pfannschmidt, 2010]. Eine Hypothese setzt verschiedene retrograde Signale an den Anfang einer plastidären Signalkette, welche in ein allgemeines, zelluläres Signalnetzwerk integriert wird. Zusammen mit anderen Signalen, z.B. Hormonsignalen, kann eine Antwort des Nukleus generiert werden (vgl. Abb. 1.8A). Eine Modifikation dieser Hypothese ist, dass plastidäre Signale zuerst in spezielle Signalnetzwerke integriert werden, bevor sie in das allgemeine zelluläre Signalnetzwerk einfließen oder über Feedback-Loops moduliert werden (vgl. Abb. 1.8 B).

Darauf aufbauend ist eine weitere Hypothese denkbar, die den Gegenentwurf zur eben beschriebenen Hypothese darstellt. Hierbei werden verschiedene retrograde Signale direkt über eigene Signalkaskaden zum Nukleus übertragen, der eine spezifisch auf das Signal zugeschnittene Antwort sendet. Die Antwort kann auch hier über Feedback-Loops moduliert werden (s. Abb. 1.8 C,D). Hier ist keine Interaktion der verschiedenen retrograden Signale zu beobachten, da bei dieser Hypothese die Pfade keine Schnittstellen aufweisen.

Bei beiden Hypothesen wird von distinkten retrograden Signalen ausgegangen. Wie jedoch anfänglich beschrieben, zeigen die unterschiedlichen Signale starke Interferenzen und könnten in ihrer Gesamtheit als Signal interpretiert werden. Dieses kann wie in der ersten Hypothese beschrieben an das allgemeine, zelluläre Signalnetzwerk übermittelt werden oder, je nach Ausprägung, wie in der zweiten Hypothese beschrieben, von unterschiedlich ausgerichteten nukleären Modulen beantwortet werden (s. Abb. 1.8 E,F). Auch hier können wieder Feedback-Loops auftreten. Weitere Hypothesen gehen von spezifischen retrograden Signalmolekülen aus [Leister, 2012] (vgl. Abb. 1.9). Das klassische retrograde Signal wird hierbei vom Organell über einen Transmitter zum Nukleus übertragen (s. Abb. 1.9A). Auch die Akkumulation des retrograden Signalmoleküls

könnte zur Modulation nukleärer Genexpression führen (vgl. Abb. 1.9B). Passive Diffusion retrograder Signale (s. Abb. 1.9C) führt auch über einen Konzentrationsgradienten zur Modulation nukleärer Genexpression, während aktiver Transport der retrograden Signalmoleküle unabhängig von der Konzentrationsstärke in allen zellulären Kompartimenten mit Ausnahmen des Nukleus' ist. In diesem Szenario (s. Abb. 1.9C, unten) ist das primäre retrograde Signal jenes, welches die Transportrate des transportierten Molekül beeinflusst. Dieses wäre demnach als sekundäres Signal anzusehen. Denkbar sind auch Mischformen der beschriebenen Hypothesen.

1. EINLEITUNG

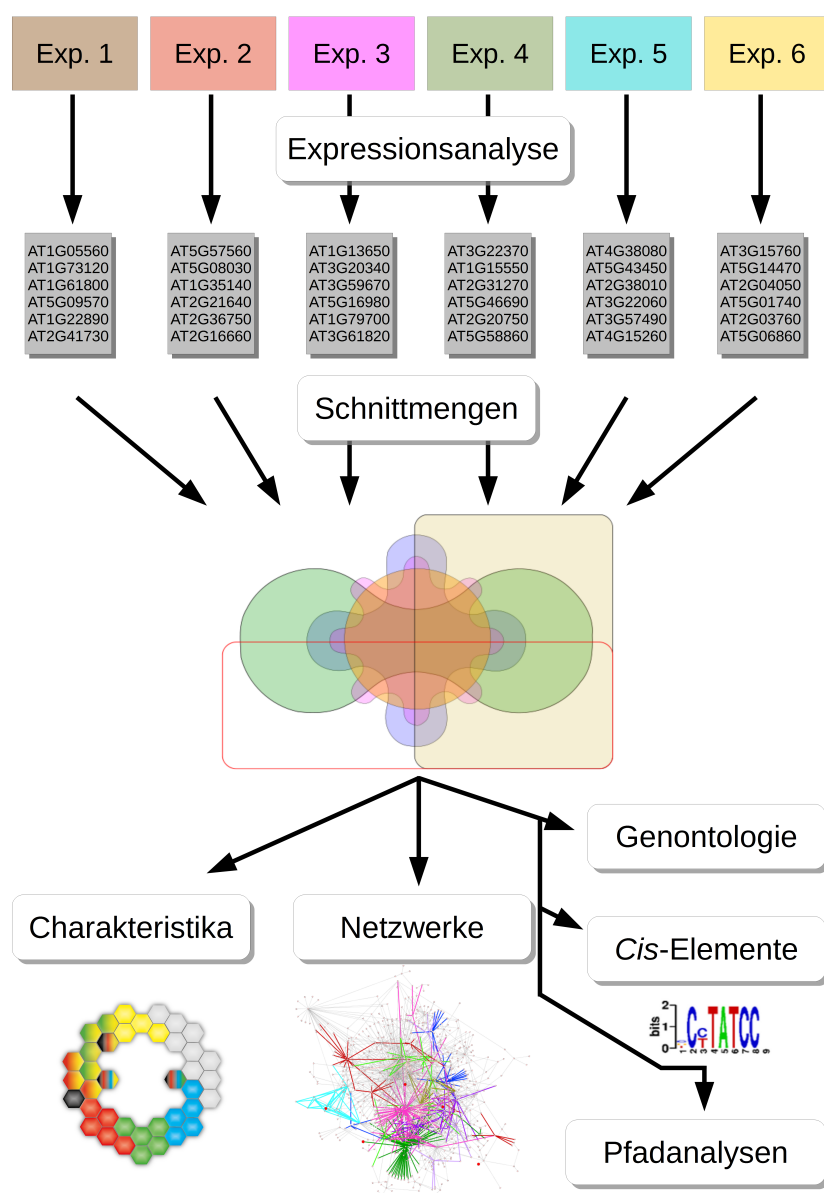


Abbildung 1.7: Die Arbeitsschritte zur Charakterisierung retrograder Module.

- Zuerst werden die Microarrays der verschiedenen Experimente auf differenzielle Expression untersucht. Die Schnittmengen der differenziell exprimierten Gene sind Gegenstand der weiteren Untersuchungen. Die zentrale Schnittmenge, die ein Grundmodul retrograder Signale widerspiegelt, wird auf ihre Charakteristika untersucht. Die Gene, welche dieses Modul formen, werden auf ihre Interaktion in Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken (PPI-Netzwerke) sowie auf ihnen gemeinsame *cis*-Elemente und angereicherte GO-Terme untersucht. Gene, die in Schnittmengen mit mindestens drei Experimenten auftreten, werden mithilfe von Pfadanalysen, Analysen nach Promotorelementen sowie angereicherter GO-Terme untersucht. Auch ihre Verknüpfung in PPI-Netzwerken wird untersucht. Im Gegensatz zum Grundmodul stellen sie eventuell laterale Module des retrograden Signals dar.

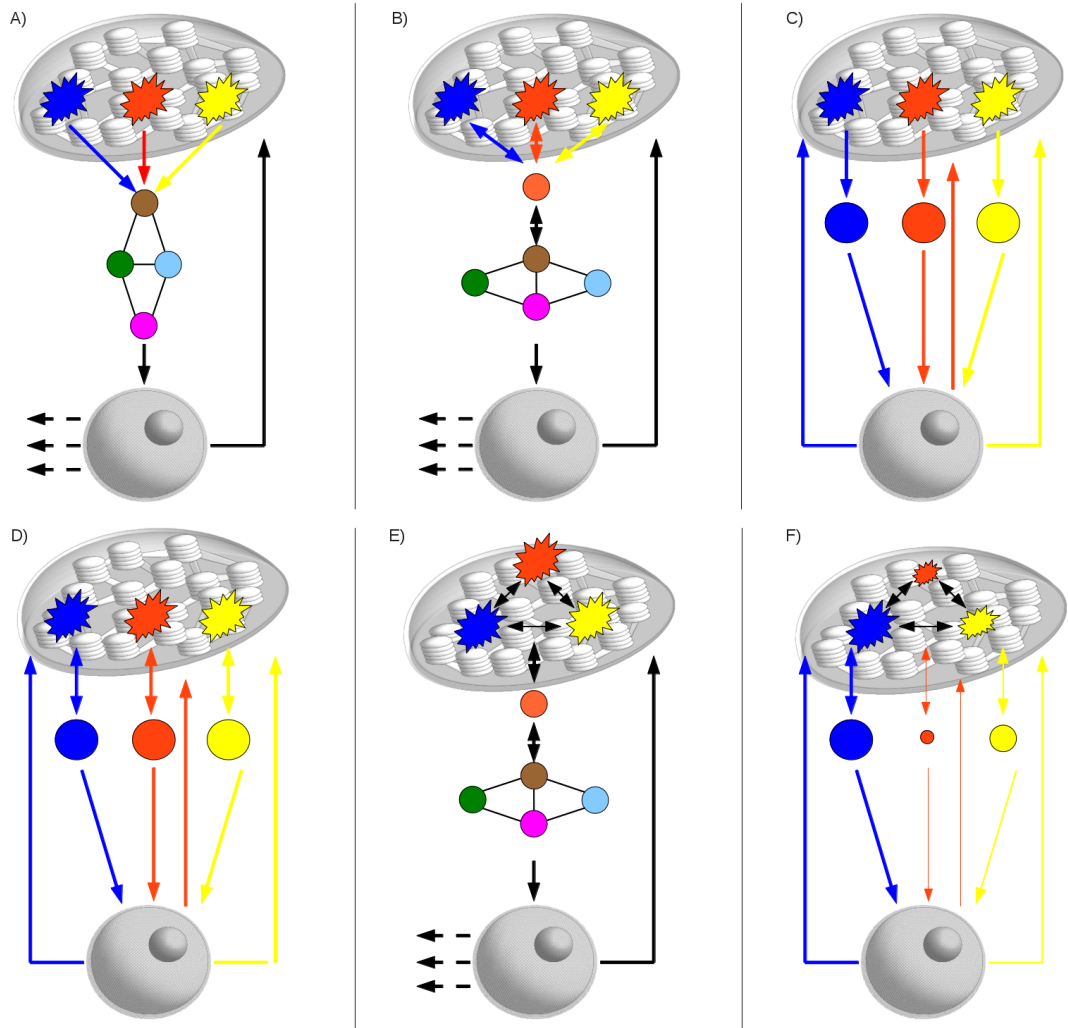


Abbildung 1.8: Hypothesen abgeleitet von Pfannschmidt, 2010. - A) Verschiedene retrograde Signale werden in das allgemeine, zelluläre Netzwerk integriert. Der Nucleus sendet anschließend Signale zurück, welche sowohl auf plastidäre Signale antworten als auch auf andere, zelluläre Signale (seitliche, gestrichelte Pfeile). B) Verschiedene retrograde Signale werden in ein primäres Modul integriert, bevor sie an das allgemeine, zelluläre Netzwerk übermittelt werden. Hier könnten auch Feedback-Loops involviert sein. Der Nucleus beantwortet die Signale wie in A) beschrieben. C) Verschiedene retrograde Signale werden über verschiedene Signalwege zum Nucleus übertragen, eventuell mit Feedback-Loops (D). E) Verschiedene retrograde Signale zeigen Interferenzen und werden in ihrer Gesamtheit als retrogrades Signal interpretiert und wie in B) beschrieben an den Nucleus gesendet oder wie in C) beschrieben, an unterschiedliche Module übertragen werden, je nach Ausprägungsstärke des verrechneten retrograden Signals (F). Hier könnten ebenfalls Feedback-Loops auftreten.

1. EINLEITUNG

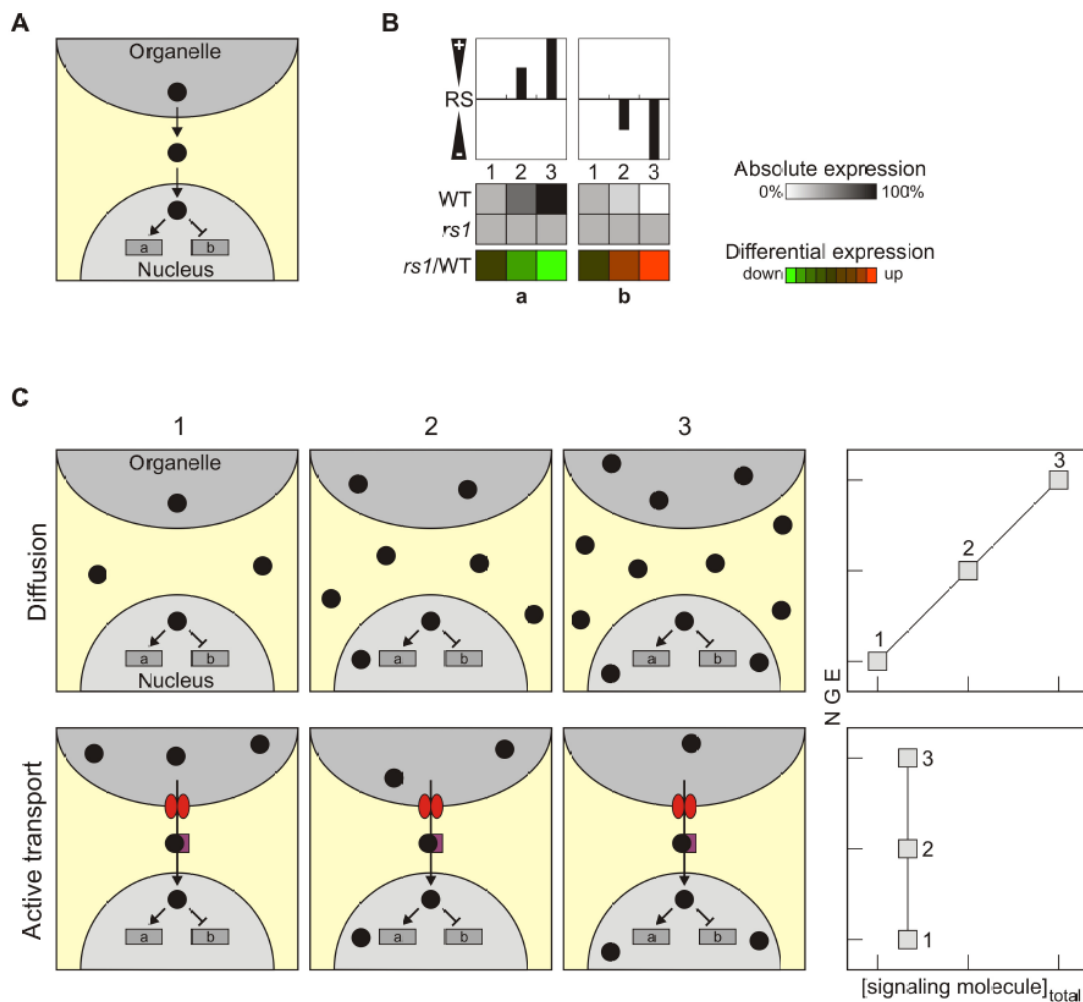


Abbildung 1.9: Hypothesen zur Übertragung retrograder Signale nach Leister, 2012. - Das klassische retrograde Signal wird über einen Sekundärtransmitter zum Nucleus übertragen (A). B) Die Konzentration des retrograden Signalmoleküls führt zu einer Modulation nukleärer Genexpression. C, oben) Das retrograde Signalmolekül diffundiert passiv und beeinflusst, wie in B) beschrieben, über seine Konzentration in allen zellulären Komponenten die nukleäre Genexpression. Diese steht in ihrer Änderung in einem linearen Abhängigkeitsverhältnis zur Konzentration des retrograden Signalmoleküls. Beim aktiven Transport dessen (C, unten) spielt lediglich die Konzentration des Moleküls im Nucleus eine Rolle. Die Gesamtkonzentration des Signalmoleküls in der Zelle ist somit von der nukleären Genexpression entkoppelt und ein direkter, linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der nukleären Genexpressionsstärke ist nicht zu beobachten. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dario Leister.

Kapitel 2

Ergebnisse

2.1 Biologische Experimente

Die Experimente der Forschergruppe (vgl. 5.1) betrachten retrograde Signale anhand verschiedener, in Kapitel 1.2.1 ff. vorgestellter Pfade und Auslöser (s. Abb. 2.1).

Zwei Experimente befassen sich mit der Modulierung der Tetrapyrrolbiosynthese als möglichen Auslöser retrograder Signale (vgl. 1.2.1). Experiment 1 inhibiert die 5-Aminolevulinsäuresynthese mithilfe von Gabaculin (GAB). Die *gun4-1* Mutante [Larkin et al., 2003] wird ebenfalls betrachtet. Sowohl die Wildtyppflanze nach Behandlung mit GAB als auch die Mutante zeigen eine reduzierte Synthese der 5-Aminolevulinsäure (5-ALA) und in Folge dessen eine reduzierte Konzentration an Tetrapyrrol und Chlorophyll. Experiment 2 betrachtet zwei transgene Linien, die als RNA-Interferenz (RNAi) Konstrukte mit den Vektoren pOpOff und pMDC7 eingeführt wurden. Die Linie CHLD pOpOff zeigt, nach Induktion mit Dexamethason, eine reduzierte Menge an transkribierter Magnesiumchelatase Untereinheit D (CHLD) und eine reduzierte Chlorophyllmenge. Die Linie CHLM pMDC7 führt nach Induktion mit β -Estradiol zu einer Hochregulation der Methyltransferase S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX (CHLM) und in Folge dessen zu einer erhöhten Menge an Chlorophyll.

Das dritte Experiment betrachtet den ROS-Signalfad als mögliche Quelle retrograder Signale. ROS-Signale werden durch verschiedene Lichtintensitäten ausgelöst (vgl. 5.1.3) und die Reaktion der Wildtyppflanze sowie einer Knock-out-Mutante betrachtet.

2. ERGEBNISSE

Diese besitzt ein mutantes Allel des RELATED TO APETALA 2.4a (RAP2.4a), das als trans-Regulator des 2CPA-Promoters agiert, der die Expression eines Antioxidationsenzym in Antwort auf oxidativen Stress reguliert [Shaikhali et al., 2008].

Zucker als möglicher Auslöser retrograder Signale wird anhand von Experiment 4 betrachtet. Drei verschiedene Mutanten mit Defekten in der Stärkebiosynthese und dem Transport von Triosephosphat [Häusler et al., 2009] werden hierbei genutzt. Die Mutante *adg1-1* besitzt ein mutantes Allel der Adenosindiphosphatglucose-Pyrophosphorylase und zeigt Defizite in der Stärkesynthese, sodass in mutanten Pflanzen weniger Stärke akkumuliert wird. Die Mutante *tpt-2* weist einen defekten Triosephosphat/Phosphat-Translokator in der inneren chloroplastidären Membran auf, sodass nur eine reduzierte Menge Triosephosphat in das Cytosol exportiert werden kann [Walters et al., 2003]. Da Fructose-1,6-bisphosphat aus zwei Molekülen Triosephosphat aufgebaut wird und ein wichtiges Intermediat in der Glycolyse darstellt, hemmt diese Mutation letztlich die Glycolyse. Die Doppelmutante *adg-1*×*tpt-2* der beiden vorgestellten Mutanten zeigt reduziertes Wachstum sowie eine reduzierte Chlorophyllmenge im Sämling [Schneider et al., 2002].

Abschließend wurden zwei Experimente herangezogen, die Redox-regulierte retrograde Signale betrachten. Experiment 5 stört diesen Signalpfad durch eine Mutation in der Thylakoid-Proteinkinase STN7 [Bonardi et al., 2005; Dietzel et al., 2008; Pesaresi et al., 2009] (vgl. 1.2.3), sodass die Kurzzeitantwort auf unbalancierte Exzitation des PSI und PSII wie in 1.2.3 beschrieben gestört wird. Das sechste Experiment betrachtet Redox-Signale ebenfalls anhand der *stn7*-Mutante und Mutanten des Photosyntheseapparats [Pesaresi et al., 2009]. Die Mutante *psad1-1* zeigt ein mutiertes Allel der D-Untereinheit des PSI (PsaD1, vgl. Abb. 1.2), während die Mutante *psae1-3* ein mutiertes Allel der E-Untereinheit des PSI (PsaE, vgl. Abb. 1.2) aufweist. Die Doppelmutanten *psad1-1*×*stn7* und *psae1-3*×*stn7* werden in diesem Experiment ebenfalls betrachtet und als Kontrolle verwendet.

Allen hier verwendeten Experimenten ist gemein, dass sie die physiologische Intaktheit des Chloroplasten gewährleisten (sogenannte *operational control* [Pogson et al., 2008]). Retrograde Signale werden somit bei allen Experimenten unter physiologischen Bedingungen untersucht.

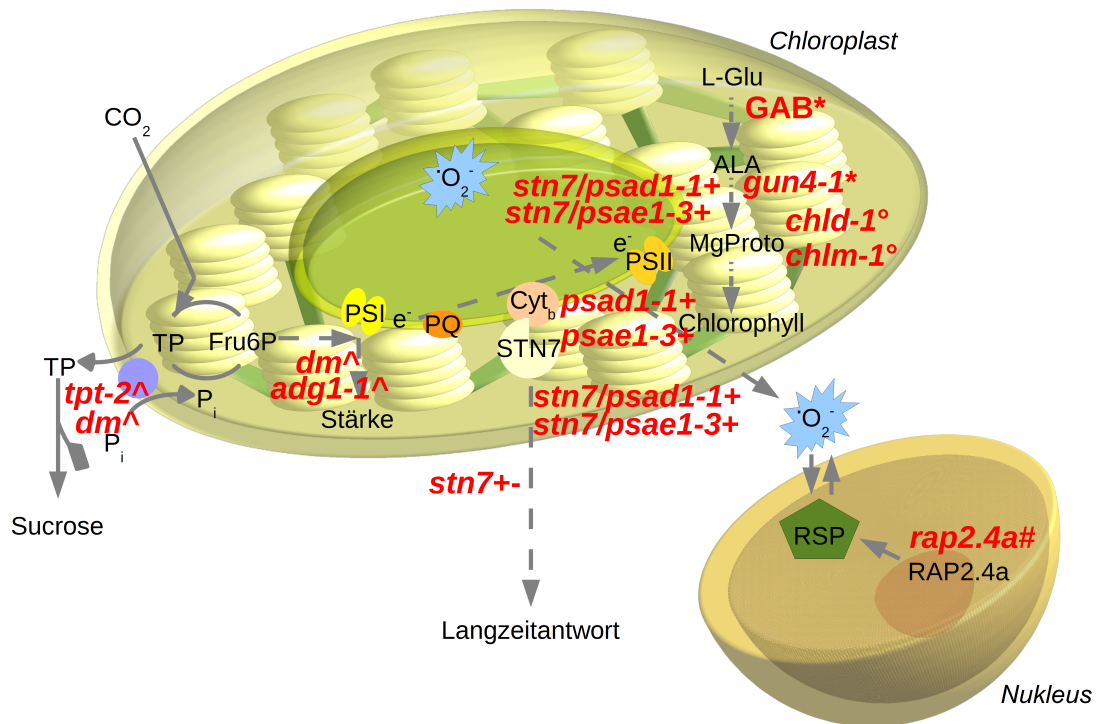


Abbildung 2.1: Übersicht über die verwendeten Experimente. - Mutanten, die einen bestimmten Pfad beeinflussen, sind in rot und fett dargestellt. Zur Unterscheidung der verschiedenen Experimente sind alle Mutanten und Behandlungen mit einem Zeichen markiert:

- * : Experiment 1, Tetrapyrrolpfad
- ° : Experiment 2, Magnesiumchelatase
- # : Experiment 3, ROS schützendes Protein (RSP)/Änderung der Lichtqualität
- ^ : Experiment 4, Stärkesynthese und Triosephosphattransport
- : Experiment 5, Redox-Signale
- + : Experiment 6, Anpassung der Photosynthese

PSII: Photosystem 2; PSI: Photosystem 1; PQ: Plastoquinon; cyt b₆: Cytochrom b₆f; 5-ALA: 5-Aminolevulinsäure; MgProtoIX: Magnesium Protoporphyrin IX; MgProtoMe: Magnesium Protoporphyrin IX Monomethylester; RSP: ROS schützendes Protein; TP: Triosephosphat; Fru6P: Fructose-6-Phosphat; ADPG: ADP-Glucose.

2.2 Schnittmengen der biologischen Experimente als Annäherung an Module des retrograden Signals

Jedes Experiment betrachtet distinkte Aspekte der retrograden Signalgebung. Bei allen Experimenten wird somit erwartet, dass das retrograde Signal sich durch Veränderung im nukleären Transkriptom manifestiert und auf den Microarrays beobachtet werden kann. Diese Veränderungen werden durch Vergleiche zwischen Mutante und Wildtyp oder Behandlung und Wildtyp, in Absprache mit den jeweils verantwortlichen Kooperationspartnern (vgl. Tabelle 5.1), pro Experiment aufgezeigt. Zu erwarten ist, dass solche Gene eine modulierte Expression in den Experimenten zeigen, die auf retrograde Signale ansprechen; jedoch können auch experimentenspezifische Gene, die beispielsweise auf Licht als Signal ansprechen, auftreten. Um alle modulierten Gene zu erfassen, wurde pro Experiment eine Liste der differenziell regulierten Gene über alle Vergleiche erstellt (vgl. Tabelle C1, s. Tabelle C2, Tabelle 2.1). Einige Experimente zeigen eine recht große Anzahl von differenziell regulierten Genen (vgl. Tabelle 2.1). Die Einzelergebnisse pro Vergleich und Experiment wurden auf Grund des gewählten Ansatzes einer Meta-Analyse nicht weiter verfolgt, sondern an die jeweiligen Kooperationspartner für experimentenspezifische Auswertungen weitergeleitet.

Gemeinsamkeiten der einzelnen Experimente sowie Unterschiede wurden anhand von Schnittmengen der Genlisten aufgezeigt (vgl. 5.5). Das Venn Diagramm nach Edward (s. Abb. 2.2) stellt die grafische Auswertung dieser Schnittmengen dar. Jedes Feld des Diagramms zeigt die Gesamtsumme der Gene an, die bei einer bestimmten Schnittmenge differenziell reguliert sind. So zeigen beispielsweise 10 Gene eine differenzielle Expression in den Experimenten 1 und 2. Diese sind exklusiv in diesen beiden Experimenten differenziell exprimiert. Auffällig ist, dass 39 Gene in allen Experimenten differenziell exprimiert sind (s. Tabelle 2.2). Die Wahrscheinlichkeit E_p einer Schnittmenge bei Unabhängigkeit der Experimente liegt gemäß

$$E_p = \prod_{k=1}^j \frac{\sum_j}{\sum_N} \quad (2.1)$$

mit \sum_j als Summe der differenziell exprimierten Gene im Experiment j und \sum_N als Summe der Gesamtanzahl an Genen N auf dem AffymetrixTM-Chip (vgl. Tabelle 2.1) bei $E_p = 2,57 \times 10^{-5}$, sodass per Zufall nur $2,57 \times 10^{-5} \times 21440 = 0,55$ Gene in der

2.2 Schnittmengen der biologischen Experimente als Annäherung an Module des retrograden Signals

Schnittmenge aller Experimente zu erwarten wären. Die Experimente zeigen jedoch 39 gemeinsame Gene und somit eine Korrelation, die auf den gemeinsamen Pfad der retrograden Signalgebung zurückgehen kann. Die Menge der 39 Gene wird im Folgenden als Grundmodul der Antwort auf das retrograde Signal oder auch als Kernantwortmodul bezeichnet und näher untersucht.

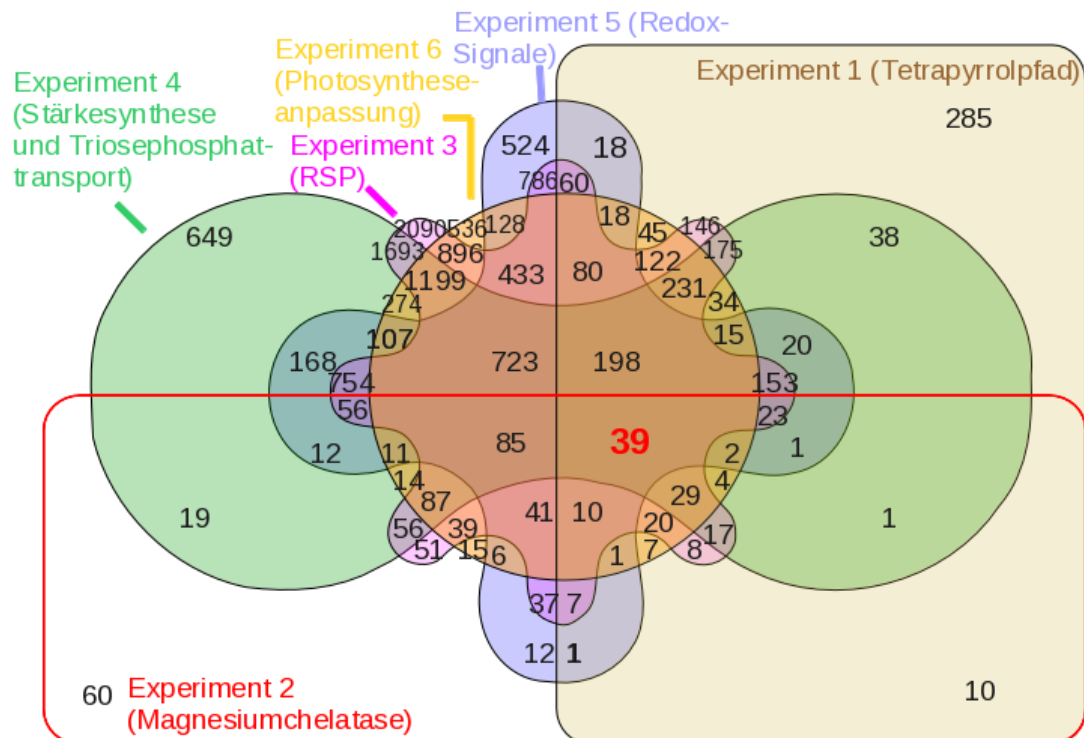


Abbildung 2.2: Darstellung der Schnittmengen der differenziell regulierten Gene in jedem Experiment. - Die Zahl in jeder Schnittmenge beschreibt, wie viele Gene exklusiv in dieser Schnittmenge differenziell reguliert sind. Beispielsweise teilen sich Experiment 1 und Experiment 2 ein Set von zehn Genen, die nur in diesen beiden Experimenten differenziell reguliert sind (vgl. Feld unten rechts). 285 Gene hingegen sind nur in Experiment 1 differenziell exprimiert. Die Gene, die in allen Experimenten differenziell reguliert sind, sind in rot hervorgehoben. RSP: ROS schützendes Protein

2. ERGEBNISSE

Tabelle 2.1: Summe der differenziell exprimierten Gene pro Experiment. - Die Summe der differenziell exprimierten Gene pro Experiment ergibt sich aus allen experiment-spezifischen Vergleichen. Sie bilden die Basis für das Venn Diagramm zur Identifizierung der Schnittmengen der einzelnen Experimente.

Experiment	Gensumme
1 (Tetrapyrrolpfad)	1818
2 (Magnesiumchelatase)	781
3 (ROS schützendes Protein, RSP)	10344
4 (Stärkesynthese und Triosephosphattransport)	6887
5 (Redox-Signale)	4529
6 (Anpassung der Photosynthese)	5449
Gesamtsumme Gene auf Affymetrix TM -Chip (TAIR9):	21440

2.2 Schnittmengen der biologischen Experimente als Annäherung an Module des retrograden Signals

Tabelle 2.2: Kurzbeschreibung der differenziell exprimierte Gene in allen sechs Experimenten. - Gene, die mit * gekennzeichnet sind, kodieren für Proteine, die im Chloroplasten lokalisiert sind.

Locus	Kurzbeschreibung nach TAIR9
AT1G11260	STP1 (SUGAR TRANSPORTER 1)
AT1G49230	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT1G56510	WRR4 (WHITE RUST RESISTANCE 4)
AT1G63180	UGE3 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 3)
AT1G66100	Thionin, putative
AT1G68440	Unknown protein
AT1G77690	LAX3 (LIKE AUX1 3)
AT2G05540	Glycine-rich protein
AT2G14660	Unknown protein
AT2G15890*	MEE14 (maternal effect embryo arrest 14)
AT2G17880*	DNAJ heat shock protein, putative
AT2G18050	HIS1-3 (HISTONE H1-3)
AT3G15630	Unknown protein
AT3G23030	IAA2 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 2)
AT3G26740*	CCL (CCR-LIKE)
AT3G29030	EXPA5 (EXPANSIN A5)
AT3G44450	Unknown protein
AT3G47420	Glycerol-3-phosphate transporter, putative
AT3G62950	Glutaredoxin family protein
AT4G04630	Unknown protein
AT4G17245	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT4G19380	Alcohol oxidase-related
AT4G28270	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT4G32280	IAA29 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29)
AT4G34770	Auxin-responsive family protein
AT4G39030	EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5)
AT5G02760	PP2C family protein
AT5G08350	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related
AT5G17860	CAX7 (CALCIUM EXCHANGER 7)
AT5G19120	Aspartic-type endopeptidase
AT5G20250*	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10)
AT5G21170*	5'-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit, putative
AT5G22920	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G24660	LSU2 (RESPONSE TO LOW SULFUR 2)
AT5G37770	TCH2 (TOUCH 2)
AT5G51460*	ATTPPA (<i>Arabidopsis thaliana</i> trehalose-6-phosphate phosphatase)
Fortsetzung auf der nächsten Seite	

2. ERGEBNISSE

Tabelle 2.2 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Kurzbeschreibung nach TAIR9
AT5G63190	MA3 domain-containing protein
AT5G64640	Pectinesterase family protein
AT5G67420	LBD37 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 37)

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

2.3.1 qPCR: Verifizierung der Expression einiger Gene des Kernantwortmoduls

Für die Verifizierung der Expression einiger Gene im Kernantwortmodul wurde eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wie in 5.3 beschrieben von Dr. Lars Dietzel, Goethe-Universität Frankfurt, und von Hagen Schlicke, Humboldt Universität zu Berlin, durchgeführt. Es wurde überprüft, ob sich Unterschiede zwischen den Expressionswerten basierend auf dem Microarray und basierend auf der qPCR zeigen. Diese können durch Unterschiede in der Amplifizierung der Transkripte bei der PCR selbst entstehen oder auch auf Ungenauigkeiten beim Microarray zurückgehen [Bustin, 2002]. Die Richtung der Expression sollte jedoch bei den meisten Genen vergleichbar sein, wenn man davon ausgehen kann, dass die Messungen der Expression nicht fehlerhaft waren.

Die Gene STP1 (AT1G11260), MEE14 (AT2G15890), IAA2 (AT3G23030), LSU2 (AT5G24660), ATTPPA (AT5G51460) sowie AT1G49230, AT4G28270, HIS1-3 (AT2G18050), AT4G34770, CCL (AT3G26740), IAA29 (AT4G32280), WRR4 (AT1G56510), AT3G62950, LAX3 (AT1G77690), AT5G64640, AT3G15630, DNAJ (AT2G17880) und AT3G44450 wurden auf ihre qPCR-Expression in Experiment 5 (vgl. 5.1.5) und der Linie CHLD pOpOff in Experiment 2 (vgl. 5.1.2) im Vergleich zur Kontrolle hin untersucht (s. Abb. 2.3 und 2.4, Abb. 2.5). Die Primersequenzen, die Effizienz der Primer sowie die Darstellung des erfolgreichen Amplifizierung der Transkripte anhand eines Agarosegels der qPCR von Dr. Lars Dietzel befinden sich im Anhang (s. Tabelle A.1, Abb. B.1), ebenso die Primersequenzen der qPCR von Hagen Schlicke (s. Tabelle A.2).

Bei fast allen Transkripten wird die Expressionsrichtung wie sie auf dem Microarray zu sehen ist bestätigt. Die Stärke unterscheidet sich jedoch, wie eingangs angenommen. Lediglich drei von insgesamt 18 Genen (IAA29 (AT4G32280), AT3G62950 sowie DNAJ (AT2G17880)) zeigen eine abweichende Expressionsrichtung zum Microarray. Betrachtet man jedoch die Fehlerbalken der jeweiligen Expressionswerte der qPCR-Messungen, so könnten auch diese Gene die gleiche Expressionsrichtung in der qPCR wie auf dem

2. ERGEBNISSE

Microarray zeigen. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Arrays die tatsächliche Expression der jeweiligen Gene gut wiedergeben und nicht fehlerhaft waren.

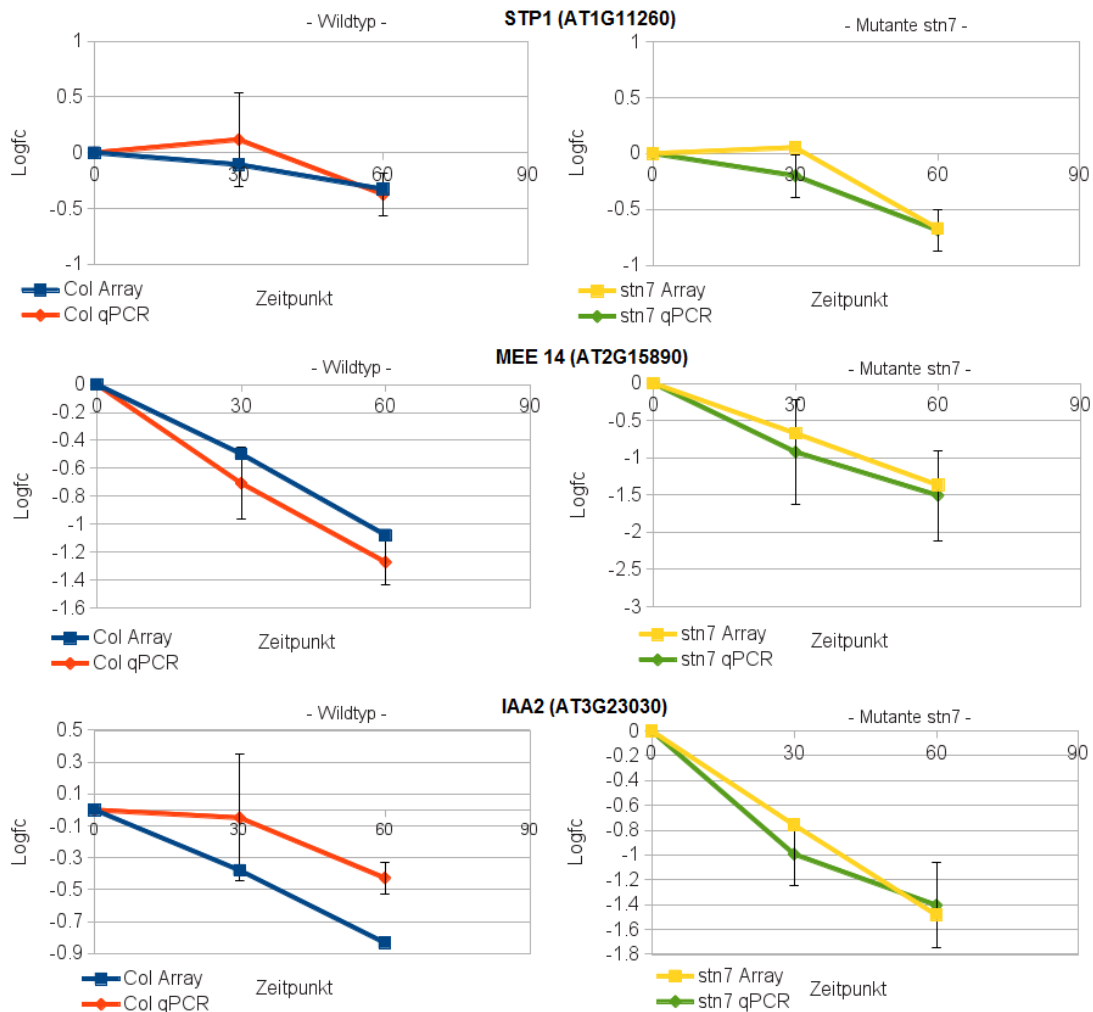


Abbildung 2.3: qPCR-Analyse der Gene STP1 (AT1G11260), MEE14 (AT2G15890) und IAA2 (AT3G23030). - Die Expression dieser Gene wurde mithilfe einer qPCR, durchgeführt von Dr. Lars Dietzel, überprüft. Die Expressionen des Arrays sowie der qPCR sind bei allen Transkripten ähnlich.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

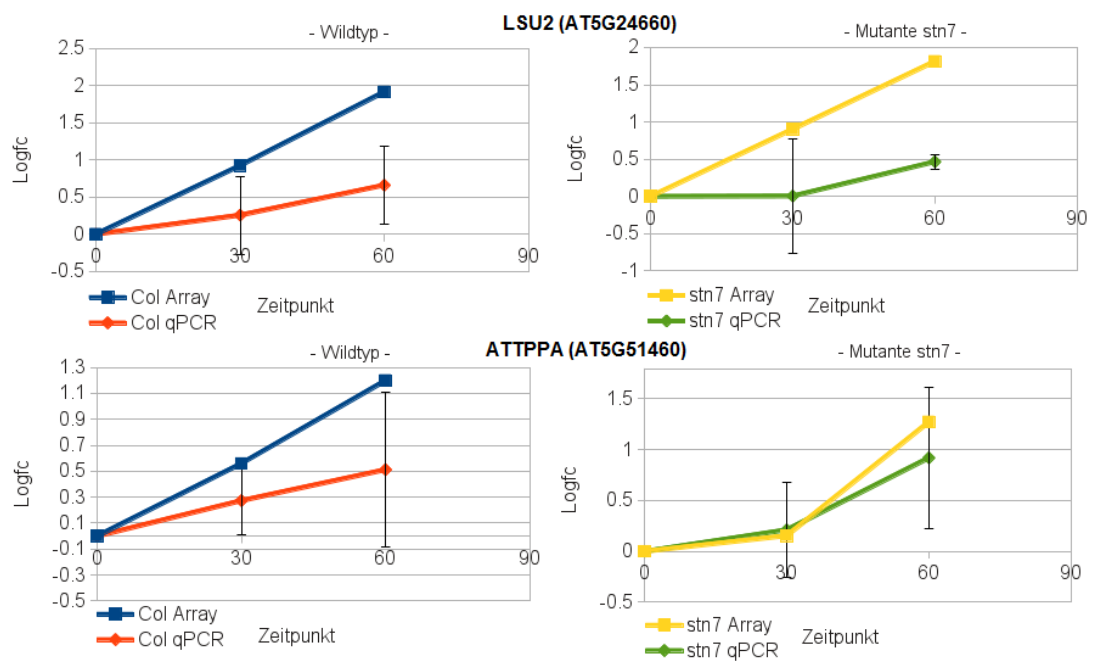


Abbildung 2.4: qPCR-Analyse der Gene LSU2 (AT5G24660) und ATTPA (AT5G51460). - Die Expression der Gene wurde mithilfe einer qPCR überprüft. Die Expressionen des Arrays sowie der qPCR sind bei ATTPA sehr ähnlich, bei LSU2 zeigen sich zum Zeitpunkt 30 Minuten jedoch Unterschiede.

2. ERGEBNISSE

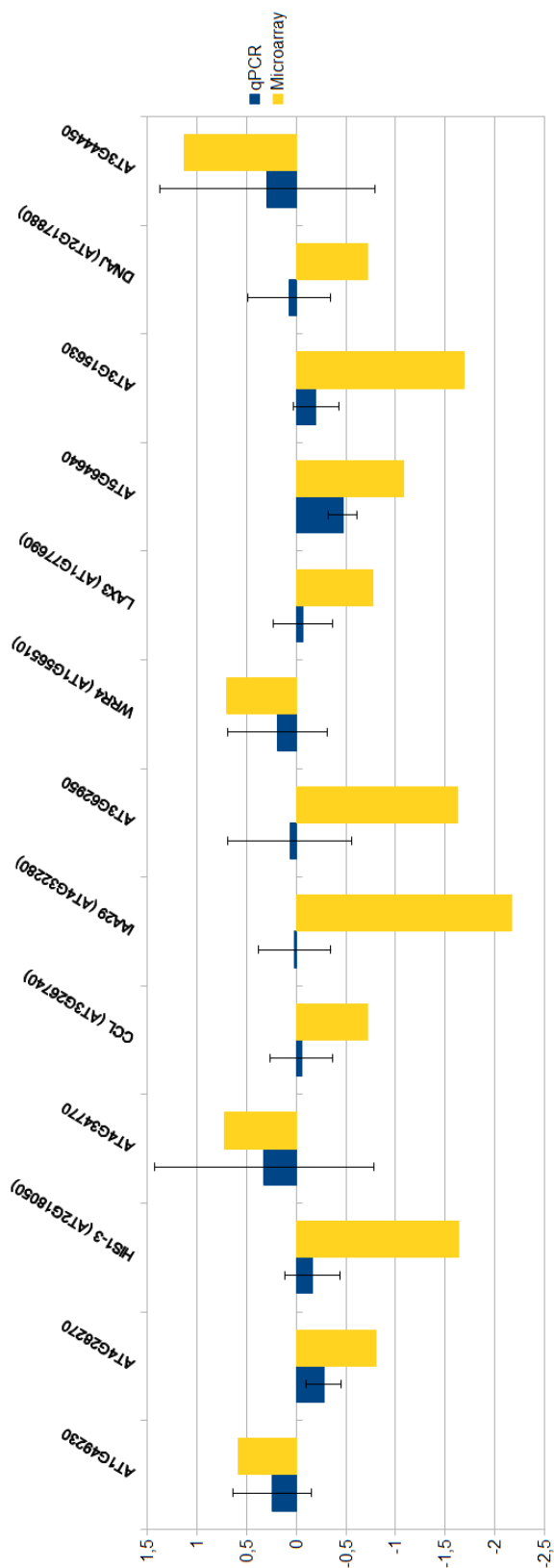


Abbildung 2.5: qPCR-Analyse der Gene AT1G49230, AT4G28270, HIS1-3 (AT2G18050), AT4G34770, CCL (AT3G26740), IAA29 (AT4G32280), AT3G62950, WRR4 (AT1G58510), LAX3 (AT1G77690), AT5G64640, AT3G15630, DNAJ (AT2G17880) und AT3G44450. - Die Expression der Gene wurde von Hagen Schlicke mithilfe einer qPCR überprüft. Die Expressionsrichtungen sind bis auf die Gene IAA29 (AT4G32280), AT3G62950 sowie DNAJ (AT2G17880) zwischen qPCR und Microarray gleich, lediglich die Stärke der Ausprägung unterscheidet sich.

2.3.2 Text Mining: literaturbasierte Charakterisierung des Grundmoduls

Die Gene im Grundmodul, welche tendenziell über alle Vergleiche eine negative Dereglulation gegenüber der Referenz zeigen (vgl. Tabelle C 3), wurden mithilfe einer GO-Anreicherungsanalyse bezogen auf die Gesamtheit aller Gene auf dem Affymetrix™ ATH1 Chip untersucht (vgl. 5.6). Die Genontologie [Ashburner et al., 2000] beschreibt die Eigenschaften aller Proteine in den Kategorien *biologischer Prozess*, *molekulare Funktion* und *zelluläres Kompartiment*. Eine GO-Anreicherungsanalyse beschreibt angereicherte Kategorien einer bestimmten Liste an Genen gegenüber der Gesamtheit aller Gene und ist als ein Standardwerkzeug etabliert, um Informationen über zu Grunde liegende biologische Prozesse, die in einer bestimmten Teilmenge an Genen vertreten sind, zu identifizieren [Huang et al., 2009]. Obwohl 39 Gene keine große Stichmenge darstellen, zeigten sich zwei Terme, *response to auxin stimulus* (GO: 0009733) und *secondary active transmembrane transporter activity* (GO:0015291), als angereichert (s. Tabelle 2.3). Nachfolgende Analysen mit Bioprofiling [Antonov, 2011], Virtual Plant [Katari et al., 2010] und Mapman [Thimm et al., 2004], welche zum Ziel hatten, diese Gene bestimmten metabolischen Pfaden zuzuordnen, zeigten keinen Erfolg. Dies hängt eventuell mit der geringen Anzahl an Genen zusammen. Auch ist zu erwarten, dass diese Gene nicht alle in einem Pfad zusammenhängen, sondern an verschiedenen Pfaden Teil nehmen. Dadurch fallen einzelne, in diesen Genen repräsentierte Pfade unter die jeweilige Signifikanzschwelle der verwendeten Programme. Auch eine Suche nach phänotypischen Auffälligkeiten der zugehörigen mutanten Linien brachte bis auf EDS5 (AT4G39030, SALK_030325 und SALK_091541), die Salicylsäure-defizient sind, und STP1 (AT1G11260, FEt_5.204-153), die zu einer Resistenz gegenüber Hygromycin führen, keine Ergebnisse [Lu et al., 2011] (arabidopsis.info, 2012; www.arabidopsis.org, 2012). Die genomische Lokalisation dieser 39 Gene zeigte ebenfalls keine Auffälligkeit wie direkte Nachbarschaft der Gene (vgl. Abb. 2.6). Daher wurde die Funktionalität und das Antwortverhalten der Grundmodulgene anhand einer Literaturrecherche untersucht (vgl. Tabelle A.3).

Neben uncharakterisierten Genen (AT2G14660, AT4G04630) sind einige der Gene (AT4G19380, AT5G51460, AT5G64640) am Aufbau der Zellwand oder deren Modifikation beteiligt. Einige (AT5G51460, AT5G67420) nehmen an Entwicklungsprozessen

2. ERGEBNISSE

sen Teil oder zeigen Reaktionen auf Stress (AT5G63190, AT5G67420). Zwei Gene nehmen an der Verteidigungsreaktion durch direkte Beteiligung (AT5G51460) oder über Induktion durch Salicylsäure (AT1G56510) Teil. Bei all diesen Genen kann bis auf Salicylsäure nicht direkt auf die beteiligten Signale geschlossen werden. Jedoch lässt die Charakterisierung der übrigen Gene eindeutige Schlussfolgerung auf beteiligte Signale zu (vgl. Abb. 2.7). Fünf der 39 Gene zeigen Abhängigkeit von Auxin oder sind an der Ausbildung von Auxin-Signalen beteiligt (AT1G77690, AT3G23023, AT4G28270, AT4G32280, AT4G34770). Fünf Gene sind an ROS-Signalen beteiligt oder reagieren auf diese (AT3G29030, AT3G44450, AT3G62950, AT4G39030, AT5G19120). Bei weiteren fünf Genen konnte die Reaktion auf oder Beteiligung an ABA-Signalen beobachtet werden (AT1G66100, AT1G49230, AT2G15890, AT2G05540, AT4G17245). Vier der Gene wurden als Zucker-induzierbar charakterisiert (AT1G11260, AT1G63180, AT5G22920, AT5G24660). Zehn Gene reagieren auf einen oder mehrere der vier Haupt-signale (AT5G21170, AT2G18050, AT5G20250, AT5G08350, AT1G68440, AT2G17880, AT3G15630, AT5G17860, AT5G02760, AT5G37770). Die Abhängigkeit von Calcium konnte in vier Genen (AT5G02760, AT5G37770, AT5G17860, AT3G26740), von denen nur AT3G26740 als rein Calcium-abhängig beschrieben wurde, gezeigt werden und stellt ein fünftes, wenn auch geringer ausgeprägtes Signal, dar.

Zusammenfassend reflektieren 29 von 39 Grundmodulgenen die Signale ROS, ABA, Auxin und Zucker. Calcium stellt ein schwächer ausgeprägtes Signal dar. Etliche Gene zeigen hierbei ein gemischtes Antwortverhalten, wie z.B. AT5G20250 (HIS1-3). Dieses wurde als induzierbar durch Zucker ([Usadel et al., 2008]) und ABA ([Fujita et al., 2005]) beschrieben. Ein anderes Beispiel ist AT5G02760, eine Proteinphosphatase 2C (PP2C), die auf alle der beschriebenen Signale reagiert. Da etliche Gene auf mehr als eines der identifizierten Signale ansprechen, ist davon auszugehen, dass das Kernantwortmodul eine hohe Interkonnektivität dieser Signale widerspiegelt. Betrachtet man die Lokalisierung der Proteinprodukte dieser Gene, so sind lediglich 6 im Chloroplasten anzutreffen (AT2G15890, AT2G17880, AT3G26740, AT5G20250, AT5G21170, AT5G51460). Diese reagieren laut Literatur auf ABA, ROS und Zucker, nicht jedoch auf Auxin.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

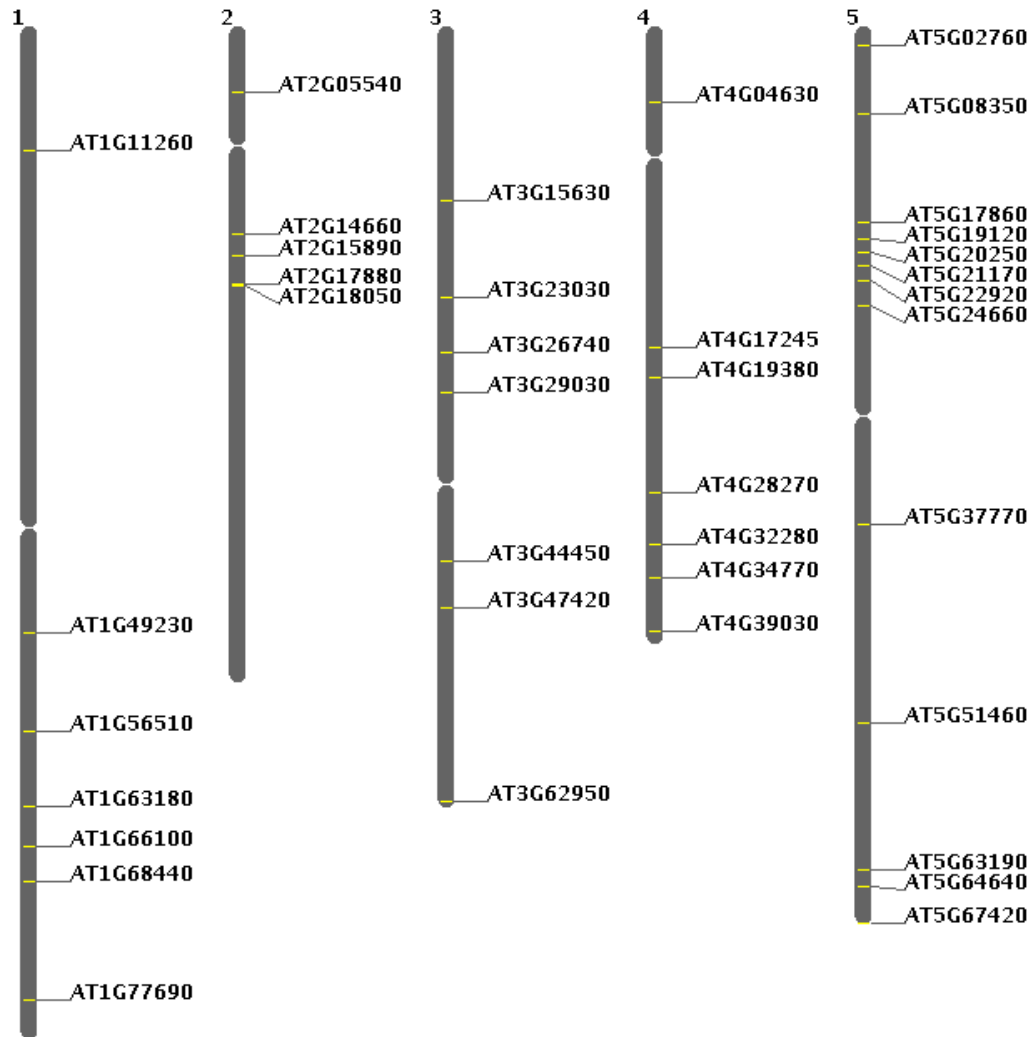


Abbildung 2.6: Genomische Position der Grundmodulgene auf den fünf Chromosomen von *A. thaliana*. - Die genomische Position der Grundmodulgene auf den Chromosomen wurde mithilfe von TAIR (www.arabidopsis.org, 2012) bestimmt.

2. ERGEBNISSE

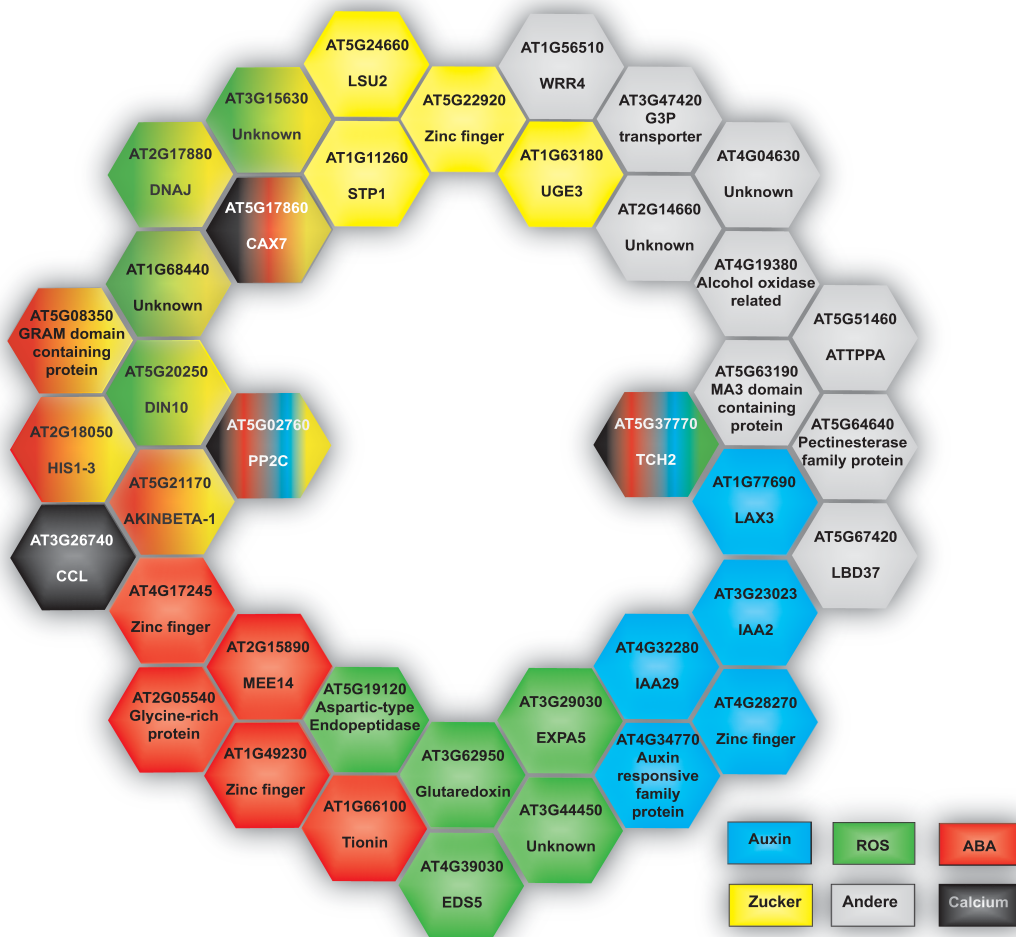


Abbildung 2.7: Charakterisierung der Gene des retrograden Grundmoduls anhand einer Literaturrecherche. - Gene, die mit Auxin in Verbindung gebracht werden konnten, sind in blau dargestellt, Gene, die mit Zucker in Verbindung stehen in gelb. Gene, die auf ROS reagieren oder mit ROS-Signalfaden in Verbindung gebracht wurden sind in grün, Gene mit einer Verbindung zu ABA in rot dargestellt. Calcium-abhängige Gene oder solche, die auf Calcium reagieren, sind schwarz dargestellt. In grau dargestellt sind solche Gene, für die keine Reaktion auf ein bestimmtes Signal oder eine Reaktion auf ein nur einmal vertretenes Signal wie Salicylsäure bekannt ist. Reagiert ein Gen auf mehr als ein Signal, so ist es entsprechend eingefärbt. Beispielsweise reagiert TCH2 laut Literatur auf ABA, Auxin und ROS und ist calcium-abhängig, weshalb es schwarz, blau, rot und grün eingefärbt ist.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

Tabelle 2.3: GO-Anreicherungsanalyse aller Gene im Grundmodul.

Locus	GO-Term	P-Wert
AT1G77690, AT3G23030, AT4G32280, AT5G37770	response to auxin stimulus (GO:0009733)	$2,018333e^{-02}$
AT1G11260, AT3G47420, AT4G39030, AT5G17860	secondary active transmembrane transporter activity (GO:0015291)	$3,040294e^{-02}$

2. ERGEBNISSE

2.3.3 Regulatorische Elemente im Grundmodul

Da die Gene des Grundmoduls durch retrograde Signale angesprochen werden, ist anzunehmen, dass sie auch ein oder mehrere regulatorische Elemente teilen. Diese könnten mit den beobachteten Signalen (vgl. 2.3.2) in Verbindung stehen oder ein noch unbeschriebenes Element sein.

Es existieren verschiedene Ansätze, die *cis*-Elemente in einer Liste an Genen ausfindig machen können. Neben phylogenetischen Ansätzen, die Motive auf Grund ihrer Konservierung in anderen Spezies ausfindig machen können (z.B. DIALIGN [Morgenstern et al., 1998]), gibt es auch Ansätze, die funktionelle Information wie transkriptionelle Koregulation nutzen. Viele dieser *ab-initio*-Ansätze nutzen dabei statistische Annahmen über das zu Grunde liegende Genom [Elemento et al., 2007] wie die Nukleotidverteilung im Gesamtgenom (z.B. AlignACE [Hughes et al., 2000]) oder den annähernd linearen Zusammenhang zwischen Expressionstärke und dem Auftreten eines bestimmten Motives (z.B. REDUCE [Bussemaker et al., 2001]). Ein Algorithmus, der keine statistischen Annahmen über das Genom oder die Expressionstärke macht und speziell für die Analyse von Expressionsdaten konzipiert wurde, ist *Finding Informative Regulatory Elements* (FIRE) [Elemento et al., 2007] (vgl. 5.8). Dieser ist somit von der Qualität der Annotation in Bezug auf Promoterelemente sowie der Ausprägung der Expression unabhängig. Ein weiterer Vorteil von FIRE ist, dass sowohl kontinuierliche Expressionsdaten wie z.B. der *Foldchange* als auch diskontinuierliche Expressionsdaten, z.B. Cluster von Genen, auf Promoterelemente untersucht werden können. Des Weiteren zeigt FIRE nicht nur überrepräsentierte, sondern im Vergleich zu anderen Gensets unterrepräsentierte Motive an. Daher wurde FIRE mit der Annotation von Promoterelementen der JASPAR-Datenbank [Sandelin et al., 2004] für die Identifizierung regulatorischer Elemente verwendet (vgl. 5.8).

Da FIRE Elemente nur im Vergleich verschiedener Sets an Genen aufdecken kann, wurden alle Schnittmengen des Venn Diagramms untersucht (s. Tabelle C4). Die Schnittmengen wurden nummeriert, um eine übersichtlichere Darstellung zu erreichen (s. Abb. 2.8). Abbildung 2.9 stellt die Gesamtauswertung dar, Tabelle A.4 zeigt die Fraktion der Gene der einzelnen Schnittmengen mit dem jeweiligen Motiv. Die Grundmodulgene besitzen laut FIRE ein überrepräsentiertes Motif, CGF1ATCAB2 (TATATAT bei K-mer 6, ATATATA bei K-mer 7). Dieses wurde erstmals als Bindestelle für CHLOROPHYLL

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

A/B BINDING FACTOR 1 (CGF1) im Promoter des CHLOROPHYLL A/B BINDING 2 (CAB2) Proteins, einem LHCB Proteins, beschrieben [Anderson und Kay, 1995]. Es beinhaltet eine konservierte I-Box, die Genexpression durch Licht als Stimulus induziert [Terzaghi und Cashmore, 1995]. Auch die Schnittmengen 5, 13, 45 und 46 zeigen eine Überrepräsentierung dieses Motivs, während die Schnittmengen 25 und 39 eine Unterrepräsentierung dessen zeigen. 33 von 39 Genen des Grundmoduls besitzen dieses Motiv (vgl. Tabelle A.5). Ein weiteres Motiv, CARG2ATAP3, wurde ebenfalls identifiziert. Dieses Motiv wurde im APETALA3 (AP3) Genpromoter beschrieben [Tilly et al., 1998]. Bei AP3 handelt es sich um einen MADS-Box Transkriptionsfaktor und Klasse B Blütenorganidentitätsgen, welches für die Ausformung der Blütenblätter und des Stamens essentiell ist [Jack et al., 1992]. Auch andere MADS-Box Transkriptionsfaktoren binden CarG-Boxen [Tilly et al., 1998]. Dieses Motiv könnte ein Hinweis darauf sein, dass Gene bestimmter Schnittmengen des Venn Diagramms Entwicklungsprozesse widerspiegeln; Gene, die in mindestens drei Experimenten differenziell reguliert sind, werden auf Promotorelemente in 2.4.1 näher untersucht. Auch bei diesem Motiv zeigten die Schnittmengen 25 und 39 wieder eine Unterrepräsentierung, ebenso wie bei dem unbekanntem Motiv mit der von FIRE optimierten Sequenz TCGC[A|T]. Eine mögliche Interpretation solcher Unterrepräsentierungen eines bestimmten Motivs ist, dass Gene, deren Promotoren diese Unterrepräsentation zeigen, für den dazugehörigen Stimulus besonders unsensibel sind.

2. ERGEBNISSE

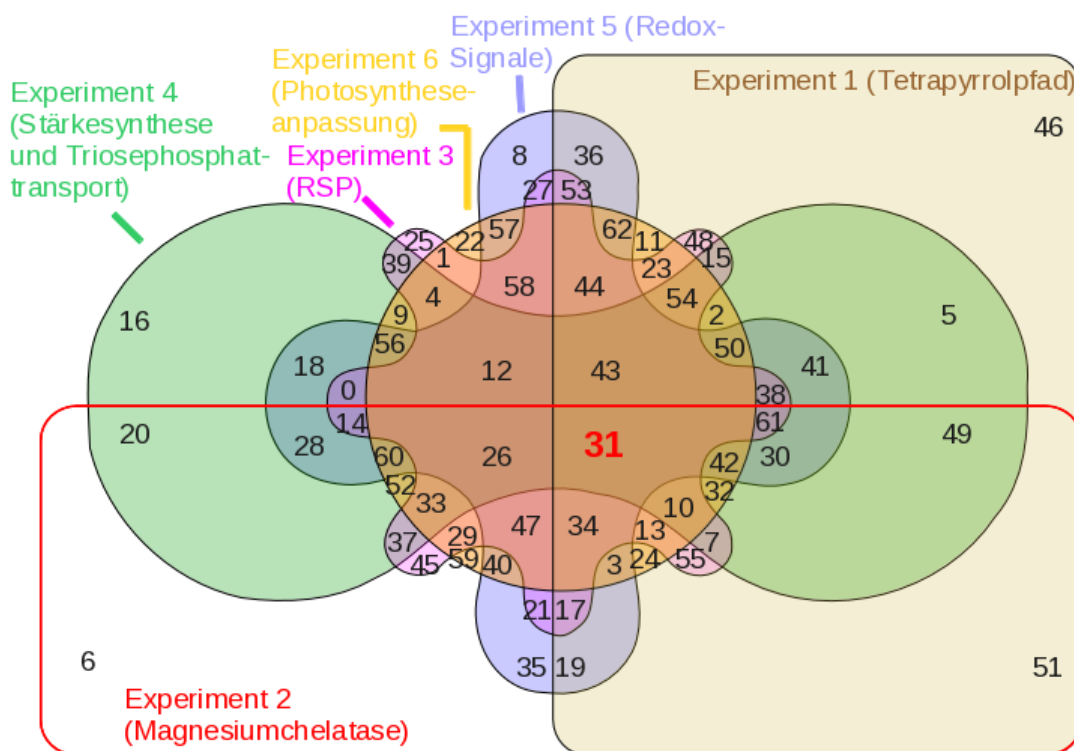


Abbildung 2.8: Verwendete Nummerierung der Schnittmengen des Venn Diagramms. - Nummerierung der Schnittmengen des Venn Diagramms zur übersichtlicheren Darstellung der FIRE-Auswertung in Abb. 2.9.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

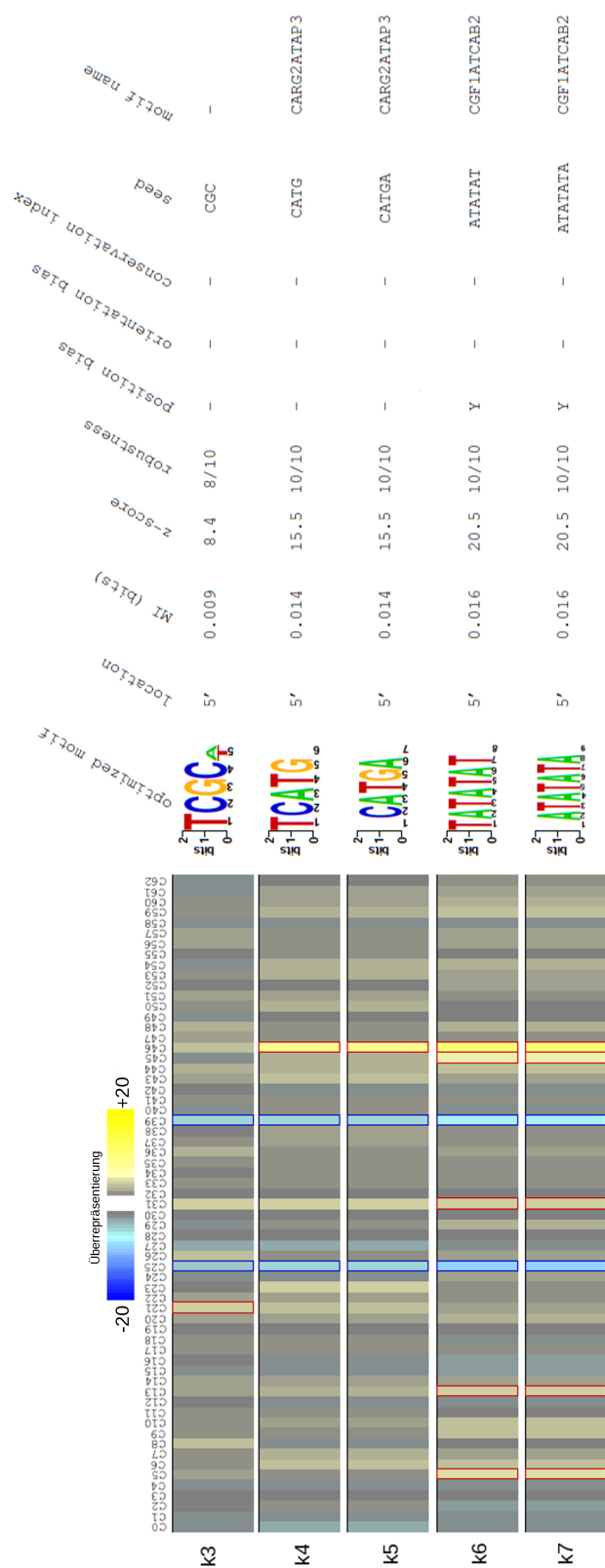


Abbildung 2.9: FIRE Ergebnis des Venn Diagramms. - Darstellung der FIRE Ergebnisse über die K-merer 3 bis 7. Die Nummerierung der Gruppen entspricht den Schnittmengen des Venn Diagramms (vgl. Abb. 2.8); c0 ist die Schnittmenge 0, c1 die Schnittmenge 1 usw. Schnittmengen, deren Gene in ihrer Promotersequenz ein Motiv überrepräsentiert zeigen, sind rot umrandet; solche, die ein Motiv unterrepräsentiert zeigen blau.

2. ERGEBNISSE

2.3.4 Einordnung der im Grundmodul vorherrschenden Hauptsignale ABA, Zucker, ROS und Auxin

Die Literaturrecherche ergab vier Hauptsignale, ABA, ROS, Zucker und Auxin, auf welche die Gene des Grundmoduls reagieren. Diese schienen gleichermaßen vertreten zu sein. Um eine mögliche Hierarchie bezogen auf die Induktionsstärke der einzelnen Signale oder mögliche Interferenzen zu beleuchten, wurden verschiedene Microarrays herangezogen (vgl. 5.2), die das Transkriptom für eines der genannten Signale untersuchen oder das Signal ROS anhand der *flu*-Mutante messen. *flu* akkumuliert im Dunkeln den Photosensibilisator Protochlorophyllid, welcher bei Belichtung Singulett-Sauerstoff 1O_2 generiert [Lee et al., 2007]. Ist nun die Mehrzahl der Gene, die das Kernantwortmodul aufbauen, bei einem dieser Arrays ebenfalls differenziell exprimiert, so kann postuliert werden, dass dieses Signal den stärksten Einfluss auf die Induktion der Gene im Grundmodul hat. Als Negativ-Vergleich wurde ein Experiment herangezogen, das die Gibberellin-Signalwirkung untersucht. Bei Gibberellin handelt es sich um ein Phytohormon, welches unter anderem Wachstumsprozesse steuert [Campbell und Reece, 2003]. Da keines der 39 Gene im Grundmodul des retrograden Signals als Gibberellin-abhängig beschrieben wurde, bietet es sich als Negativ-Vergleich an. Ein weiteres Experiment betrachtet Hochlicht. Bisher wurden Licht-Signale als nicht separierbar von retrograden Signalen beschrieben [Pfannschmidt, 2010; Ruckle et al., 2007] und sind durch das gefundene Motiv der Gene des Kernantwortmoduls (vgl. 2.3.3) eventuell an deren Induktion beteiligt. Jedoch ist keines der Gene im Zusammenhang mit Lichtinduktion beschrieben worden (vgl. 2.3.2). Zu erwarten ist, dass die differenziell regulierten Gene der hier verwendeten Arrays mit den Signalen ABA, ROS, Auxin, Zucker und Hochlicht eine Schnittmenge mit den 39 Genen aufweisen. Die differenziell regulierten Gene des Gibberellin-Arrays sollten jedoch keine Schnittmenge mit den Genen des Kernantwortmoduls zeigen. Zusätzlich wurde ein Experiment herangezogen, das die Behandlung von Wildtyppflanzen mit Norflurazon unbehandelten Wildtyppflanzen gegenüberstellt [Koussevitzky et al., 2007]. Norflurazon, ein Herbizid, inhibiert die Carotenoidsynthese und reprimiert die Expression nukleär kodierter photosynthetischer Gene (vgl. 1.4). Es wurde für die Identifikation von Mutanten, die einen Defekt bei retrograder Signalgebung aufweisen, verwendet.

Differenziell regulierte Gene der mit Norflurazon behandelten Wildtyppflanzen zeigen

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

die größte Schnittmenge mit den Genen des Kernantwortmoduls mit 20 von 39 Genen (s. Tabelle 2.4). Bei der Norflurazon-Behandlung interferieren Tetrapyrrol-, ABA- und ROS-Signale, sodass die Interferenz dieser Signale die große Schnittmenge mit den Genen des Kernantwortmoduls erklären könnte. Das Experiment von Dr. Iris Finkemeier, welches zur Zeit noch nicht publiziert ist (27.11.2012), untersuchte Zucker als Signal und zeigte hierbei die zweitgrößte Schnittmenge mit 13 von 39 Genen des Kernantwortmoduls. Die drittgrößte, jedoch deutlich kleinere Schnittmenge mit vier von 39 Genen, zeigt sich bei ABA [Böhmer und Schroeder, 2011]. Diesem folgen das Experiment, welches die Wirkung von Auxin untersucht [Armstrong et al., 2004], sowie jenes, das ROS anhand der *flu*-Mutante betrachtet [Lee et al., 2007] mit jeweils drei Genen. Der Negativ-Test Gibberellin [Ribeiro et al., 2012] zeigt keine Schnittmenge mit den Kernmodulgenen. Auch zeigt das Experiment, welches Hochlicht betrachtet [González-Pérez et al., 2011], keine Schnittmenge mit diesen Genen. Die Wahrscheinlichkeit der Schnittmengen bei angenommener Unabhängigkeit der Experimente wurde wie in 2.1 berechnet. Hiernach liegt der Erwartungswert pro Schnittmenge bei unter einem Gen, sodass alle Schnittmengen grösser als Null statistisch signifikant sind. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die in der Literatur identifizierten Signale tatsächlich die Gene des Grundmoduls induzieren. Jedoch zeigen die Gene, welche im Hochlicht-Experiment differenziell reguliert sind, keine Übereinstimmung mit dem Grundmodul. Möglicherweise ist das gefundene Motiv somit zwar als lichtabhängig beschrieben, aber reagiert auch auf einen anderen, noch nicht beschriebenen Stimulus.

Auffällig ist, dass viele der Gene, welche in der Literatur als auf ein bestimmtes Signal ansprechbar beschrieben wurden, bei Microarraystudien, die ein anderes Signal betrachten, reguliert sind. Beispielsweise ist AT1G77690 in der Literatur als Auxin-induzierbar beschrieben, aber bei dem verwendeten ABA-Array differenziell reguliert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Signale teilweise interferent sind und die Gene im Grundmodul diese Interferenz anhand ihres Induktionsverhaltens widerspiegeln.

2. ERGEBNISSE

Tabelle 2.4: Schnittmenge verschiedener Arrays mit dem Kernantwortmodul.

- Angegeben ist die Induzierbarkeit der Grundmodulgene laut Literatur durch die Signale Zucker, ABA, Auxin, Calcium, und ROS. Die Wahrscheinlichkeit E_p einer Schnittmenge bei Unabhängigkeit der Experimente wurde wie in 2.1 beschrieben berechnet.

Experiment	Locus	Literatur	% der Kernmodulgene (E_p)	\sum differenziell regulierte Gene
Norflurazon	AT1G11260	Zucker	51,28 ($4,74 \times 10^{-6}$)	3951
	AT1G49230	ABA		
	AT1G63180	Zucker		
	AT1G66100	ABA		
	AT1G68440	ROS, Zucker		
	AT2G05540	ABA		
	AT3G23030	Auxin		
	AT3G26740	Calcium		
	AT3G29030	ROS		
	AT3G44450	ROS, Zucker		
	AT3G62950	anderes Signal		
	AT4G28270	Auxin		
	AT5G02760	ABA, Auxin, Zucker, Calcium		
	AT5G08350	Zucker, ABA		
	AT5G19120	Zucker, ROS		
	AT5G20250	Zucker, ROS		
	AT5G21170	Zucker, ABA		
	AT5G22920	Zucker		
	AT5G24660	Zucker, ROS		
AT5G63190	Anderes Signal			
Zucker	AT5G19120	ROS	33,33 ($1,2 \times 10^{-6}$)	1008
	AT4G28270	Auxin		
	AT5G21170	ABA, Zucker		
	AT5G24660	Zucker		
	AT4G17245	ABA		
AT5G37770	Calcium, ABA, Auxin, ROS			
Fortsetzung auf der nächsten Seite				

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

Tabelle 2.4 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Experiment	Locus	Literatur	% der Kernmodulgene (E_p)	\sum differenziell regulierte Gene
	AT2G15890 AT3G62950 AT1G63180 AT1G68440 AT5G67420 AT5G22920 AT3G15630	ABA ROS Zucker Zucker, ROS Anderes Signal Zucker Zucker, ROS		
ABA	AT2G05540 AT2G18050 AT1G77690 AT5G67420	ABA ABA, Zucker Auxin Anderes Signal	10,26 ($2,93 \times 10^{-6}$)	2443
Auxin	AT3G23030 AT4G32280 AT5G02760	Auxin Auxin Calcium, ABA, Auxin, Zucker	7,69 ($5,63 \times 10^{-8}$)	47
Singulett-sauerstoff (<i>ftu</i>)	AT5G17860 AT3G29030 AT4G39030	Calcium, ABA, Zucker ROS ROS	7,69 ($1,58 \times 10^{-6}$)	1315
Gibberellin (Negativ-Test)			0 ($1,49 \times 10^{-7}$)	124
Licht			0 ($3,96 \times 10^{-8}$)	33

2. ERGEBNISSE

2.3.5 Alternatives Spleißen im Grundmodul

Neben den Signalen ABA, Auxin, Zucker und ROS könnten auch andere Mechanismen die Gene des Grundmoduls in ihrer Expression steuern. So könnten die Gene durch alternatives Spleißen, welches eine große Rolle in der Regulation genetischer Expression in Pflanzen spielt [Barbazuk et al., 2008; Syed et al., 2012], reguliert werden. Es bezeichnet die Bildung unterschiedlicher mRNA-Sequenzen aus der gleichen prä-mRNA-Sequenz eines Genes, welche als Konsequenz zu unterschiedlichen Proteinen führt. Diese unterschiedlichen Sequenzen wären auf einem Microarray nicht zu unterscheiden, da sie dennoch die gleiche Reportersequenz binden würden. Es wäre daher möglich, dass auch die Gene des Grundmoduls auf diese Weise reguliert sind und nicht nur durch ABA, Auxin, Zucker und ROS reguliert werden. Um dies zu untersuchen, wurden die Gene des Kernantwortmoduls mithilfe der ASIP Datenbank [Wang und Brendel, 2006] sowie aktuellen RNA-Seq-Daten [Marquez et al., 2012], auf alternatives Spleißen untersucht. Laut ASIP, welches auf TAIR6 basiert, sind von allen Genen im Grundmodul alternative Spleißvarianten bekannt. Betrachtet man den prozentualen Anteil von 3,82% an laut ASIP alternativ gespleißten Genen basierend auf der Gesamtzahl an annotierten Genen in TAIR6, so liegt der beobachtete Anteil von 100% deutlich über dem Erwartungswert. Jedoch weisen laut den RNA-Seq-Daten, die auf TAIR10 basieren, lediglich 13 der Gene alternative Spleißvarianten auf (s. Tabelle 2.5). Im Vergleich zum Anteil von 48,46% der Gene, die alternative Spleißvarianten aufweisen, gegenüber der Gesamtzahl in den RNA-Seq-Daten liegt dies mit einem Anteil von 33,33% unter den statistischen Erwartungen.

Die Datensätze zeigen somit stark unterschiedliche Ergebnisse. Diese sind eventuell sowohl auf die ältere Annotation in der ASIP Datenbank als auch auf die geringere Sensitivität der in dieser Datenbank verwendeten ESTs gegenüber den RNA-Seq-Daten [Wang et al., 2012] zurückzuführen. Betrachtet man die Ergebnisse der neueren RNA-Seq-Daten, so zeigen nur wenige Gene des Grundmoduls alternative Spleißvarianten. Es ist somit möglich, dass alternatives Spleißen bei der Regulation der Gene im Grundmodul nur eine untergeordnete Rolle spielt.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

Tabelle 2.5: Alternativ gespleißte Gene in TAIR10. - Dargestellt sind Loci, die laut RNA-Seq-Daten [Marquez et al., 2012] alternativ gespleißte mRNAs aufweisen.

*: Proteinprodukt befindet sich im Chloroplasten

Locus	Kurzbeschreibung (TAIR9)
AT1G11260	STP1 (SUGAR TRANSPORTER 1)
AT2G18050	HIS1-3 (HISTONE H1-3)
AT3G47420	Glycerol-3-phosphate transporter, putative
AT3G62950	Glutaredoxin family protein
AT4G32280	IAA29 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29)
AT4G34770	Auxin-responsive family protein
AT4G39030	EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5)
AT5G08350	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related
AT5G20250*	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10)
AT5G21170*	5'-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit, putative
AT5G22920	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G51460*	ATTPPA
AT5G63190	MA3 domain-containing protein

2. ERGEBNISSE

2.3.6 Einbettung des Grundmoduls in PPI-Netzwerke

Bisher wurde das Kernantwortmodul unabhängig von zellulären Signalnetzwerken charakterisiert. Um seine Verknüpfung zu anderen Modulen des zellulären Signalnetzwerkes oder zu metabolischen Netzwerken zu beleuchten, wurde die Verknüpfung der Proteinprodukte der Gene, die das Kernantwortmodul bilden, zu anderen Proteinen untersucht. Hierfür wurden verschiedene PPI-Interaktionsnetzwerke oder auch Interaktome genutzt und ein Subnetzwerk, bestehend aus den Grundmodulgenen sowie ihren direkten Interaktionspartnern, aufgebaut (s. 5.10). Das anschließende Vorgehen zur Identifikation der Module in diesen Subnetzwerken wurde vom Arabidopsis Interactome Mapping Consortium [Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011] adaptiert und für die folgenden Analysen angepasst. Das Subnetzwerk wurde mit dem *linkcomm*-Algorithmus [Kalinka und Tomancak, 2011] unter Standardeinstellungen in Verknüpfungsgruppen [Ahn et al., 2010] geclustert. Gruppen, die aus mindestens 5 Proteinen bestanden, wurden mithilfe einer GO-Anreicherungsanalyse charakterisiert (vgl. 5.6). Für die Auswertung und Darstellung der Charakteristika dieser Gruppen wurden in ihnen angereicherte Terme, die einen biologisch ähnlichen Prozess beschreiben, als Kategorien zusammengefasst.

Die Verknüpfung der Proteine bzw. der sie kodierenden Gene der Verknüpfungsgruppen zu miRNAs, kleinen, zwischen 21 und 23 Nukleotid langen RNA-Stücken, wurde ebenfalls untersucht. MiRNAs modulieren etliche Prozesse in Pflanzen wie z.B. Genexpression und Entwicklung [Jones-Rhoades et al., 2006]. Diese können zwar nicht auf den genutzten AffymetrixTM-Chips beobachtet werden, ihre Verknüpfung zu bestimmten Proteinen bzw. Genen als Ziele kann jedoch mithilfe der miRBase Datenbank [Kozomara und Griffith-Jones, 2011] (vgl. 5.10) bestimmt werden. Von den Grundmodulgenen sind vier als Ziele von miRNAs bekannt (s. Tabelle 2.6). Basierend auf TAIR9 zeigen sich 4,6% der *A. thaliana* Gene als Ziel von miRNAs. Betrachtet man jedoch die Gene des Grundmoduls, so sind mit 10,26% deutlich mehr Gene als durchschnittlich erwartet Ziel einer miRNA. Dies erlaubt die Hypothese, dass die Expression der Gene im Grundmodul daher wahrscheinlich nicht nur durch die identifizierten Signale, sondern auch über miRNAs gesteuert wird. Es wird daher überprüft, ob auch die Netzwerke einige verknüpfte miRNAs aufzeigen und Regulationen über miRNAs statt finden. Außerdem sollten die Subnetzwerke basierend auf dem Kernantwortmodul trotz unterschiedlicher

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

Größe und Datengrundlage ähnliche Module aufweisen, da es sich bei allen um an die retrograde Signalgebung angeschlossene Module handelt.

Tabelle 2.6: Grundmodulgene als Zielgene von miRNAs. - Die hier aufgelisteten Grundmodulgene sind als Ziel von miRNAs bekannt.

Grundmodulgen (Beschreibung nach TAIR9)	miRNA
AT4G04630 (Unknown protein)	ath-miR414
AT4G28270 (Zinc finger)	ath-miR5655
AT5G21170 (AKINBETA2)	ath-miR419
AT5G64640 (Pectinesterase)	ath-miR866-3p

2. ERGEBNISSE

2.3.6.1 Netzwerk basierend auf Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Interaktionen

Eines der verwendeten Interaktome wurde 2011 vom Arabidopsis Interactome Mapping Consortium [Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011] vorgestellt. Das Netzwerk basiert auf Protein-Protein-Interaktionen, die mittels des Y2H-Ansatzes ermittelt wurden, und umfasst 2661 Proteine verknüpft über 5664 binären Interaktionen. Dieses Netzwerk deckt nur ca. 2% der geschätzten Protein-Protein-Interaktionen in *A. thaliana* ab und lediglich fünf der Grundmodulgene sind in diesem Netzwerk vertreten (AT4G28270, AT3G23030, AT5G24660, AT2G17880, AT5G20250), sodass möglicherweise nicht alle oder auch keine der identifizierten Signale im Subnetzwerk wiedergefunden werden können.

Da das Subnetzwerk, bestehend aus den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern, zu klein für die erfolgreiche Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus' ausfiel (53 Interaktionen, 58 Proteine; vgl. Tabelle C5), wurden indirekte Interaktionspartner bis zum dritten Grad miteinbezogen. Das Subnetzwerk umfasste 995 Proteine mit 2154 binären Interaktionen (s. Tabelle C6) und 63 interagierenden miRNAs (s. Tabelle A.6). Nach Gruppierung der Verknüpfungen mithilfe des *linkcomm*-Algorithmus' bestand das Subnetzwerk aus 1681 binären Verbindungen, aufgebaut aus 931 Proteinen (s. Tabelle C7). Das Subnetzwerk beinhaltet 164 Knotenpunkte oder Hubs, die sich durch einen höheren Verknüpfungsgrad als den gerundeten, mittleren Verknüpfungsgrad $\bar{m} = 4,30$ des Netzwerkes auszeichnen (vgl. Abbildung B.2). Der stärkste Hub, AT1G22920, besitzt 127 Interaktionspartner. Zwei der Hubs sind Vertreter der Grundmodulgene (AT3G23030, AT5G24660) mit 8 und 34 Interaktionspartnern.

Insgesamt wurden im Subnetzwerk 67 Verknüpfungsgruppen mithilfe einer GO-Anreicherungsanalyse charakterisiert und die Terme, die in der jeweiligen Verknüpfungsgruppe überrepräsentiert sind, kategorisiert (s. Tabelle C8). Nur solche Kategorien, die durch mindestens zwei Gruppen vertreten sind, sind grafisch dargestellt (s. Abb. 2.10; vgl. Tabelle C8, Tabelle A.7). Jeweils sechs Gruppen zeigen Terme der Kategorien *Translation/Ribosom/mRNA Prozession* und *Redox Homöostase* (vgl. Tabelle A.7). Jeweils fünf Gruppen zeigen Terme der Kategorien *Auxin/Transkription* sowie *Transkription/Genexpression*. Auxin als angereicherter Terminus wurde bereits bei der Charakterisierung der Grundmodulgene gefunden (vgl. Tabelle 2.3).

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

Trotz der Annahme, nicht alle oder auch keine der Signale, die anhand der Literaturrecherche identifiziert wurden (vgl. 2.3.2), im Subnetzwerk wiederfinden zu können, wurde Auxin in den Kategorien wiedergespiegelt. *Redox Homöostase* könnte auf eine Beteiligung von ROS hindeuten, da die Generation von ROS eng mit dem Redox-Status verknüpft ist (vgl. 1.2.3). Calcium, welches ein untergeordnetes Signal darstellte, ist auch in den Kategorien vertreten. Des Weiteren fällt auf, dass die Photosynthese sowie der Chloroplast als Kategorien vertreten sind. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Rolle der retrograden Signalgebung als Anpassung chloroplastidärer Funktionen. Eine Übersicht, welche der Grundmodulgene zu den Gruppen einer bestimmten Kategorie beitragen findet sich in Tabelle A.7.

2. ERGEBNISSE

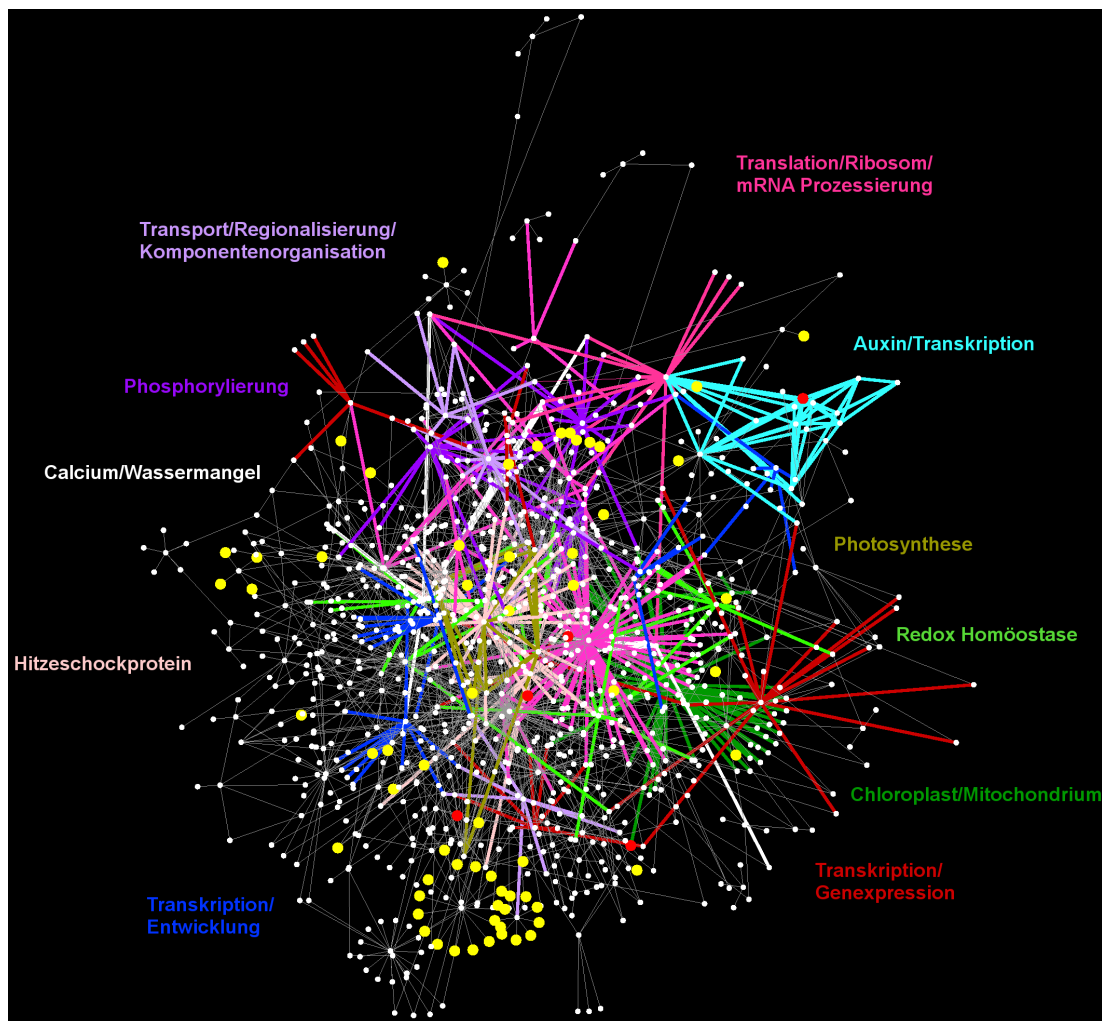


Abbildung 2.10: Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf dem Y2H-Datensatz sowie den Grundmodulgenen, ihren direkten und indirekten Interaktionspartnern. - Rote Knoten stellen die Grundmodulgene, gelbe Knoten die miRNAs dar. Gruppen, deren Gene angereicherte GO-Terme zu einer bestimmten Kategorie gehörig zeigen, sind farbig dargestellt. Eine Übersicht über die Kategorien, die Anzahl der zugehörigen Gruppen und Grundmodulgene befindet sich in Tabelle A.7

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

2.3.6.2 Netzwerk basierend auf ANAP

Beim Interaktom basierend auf Y2H-Daten sind nur fünf der 39 Gene des Kernantwortmoduls im Netzwerk vertreten. Daher wurde des Weiteren das ANAP [Wang et al., 2012] Interaktom genutzt. Es besteht aus 15 208 Interaktoren und 201 699 binären Interaktionen, die aus verschiedenen Datenbanken (APID [Prieto und de Las Rivas, 2006], BIND [Bader et al., 2003], BioGRID [Stark et al., 2006; Stark et al., 2011], ChEMBL [Overington, 2009], DIP [Xenarios et al., 2000; Xenarios et al., 2002], IntAct [Aranda et al., 2010], InteroPORC [Michaut et al., 2008], iRefIndex [Razick et al., 2008], MINT [Ceol et al., 2010], MolCon [Aranda et al., 2010], STRING [Jensen et al., 2009; Szklarczyk et al., 2011], Y2H-Daten [Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011]) zusammengetragen wurden. Die Grundmodulgene sollten vollständig oder fast vollständig erfasst sein. Da ANAP eine wesentlich höhere Netzwerkabdeckung als das Y2H-Interaktom aufweist, ist es möglich, dass bei ANAP die Module eine breitere Abdeckung verschiedener Signale aufweisen.

Insgesamt sind 26 der Grundmodulgene in ANAP enthalten (vgl. Tabelle C9), weshalb es hier möglich war, ein Netzwerk basierend auf den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern aufzubauen. Nach Gruppieren der Interaktionen mithilfe des *linkcomm*-Algorithmus' verblieben 19 der Grundmodulgene im Subnetzwerk, welches aus 456 Interaktionen und 354 interagierenden Proteinen bestand (vgl. Tabelle C10). 16 miRNAs (s. Tabelle A.8) interagieren mit dem Subnetzwerk und verknüpfen einige Module (s. Abb. 2.11). Der mittlere Verknüpfungsgrad \bar{m} liegt mit 2,56 unter dem des Netzwerkes basierend auf Y2H-Daten (s. Abb. B.3, vgl. Abb. B.2).

Es wurden anschließend 12 Gruppen mithilfe der GO-Anreicherungsanalyse untersucht und kategorisiert (s. Tabelle C11). Im Vergleich zum Subnetzwerk, welches nur auf Y2H-Daten aufbaut, sind die Kategorien bei einigen Gruppen durchmischer und von nur jeweils einer Gruppe vertreten. Die Module bei ANAP scheinen somit stärkere Interferenzen als beim Y2H-Interaktom zu zeigen. So zeigt die Gruppe 10 Terme, die als *Transkription*, *Auxin*, *Tropismus*, *Entwicklung* und als Zellkompartiment *Nukleus* kategorisiert werden können. Im Vergleich zum Y2H-Interaktom sind etliche Kategorien, wie beispielsweise *Auxin/Transkription*, dennoch auch bei den Verknüpfungsgruppen in ANAP vertreten. Einige Kategorien treten allerdings zusätzlich auf, wie z.B. die Kategorie *Antwort auf Kälte/ABA* oder *Dissaccharid metabolischer Prozess*. Die Annahme,

2. ERGEBNISSE

dass ANAP mehr Module verschiedener Signale als das Y2H-Interaktom aufweist, ist somit bestätigt. Auffällig ist, dass eine miRNA (athmiR419) zwei Module verbindet. Diese Beobachtung unterstreicht eine mögliche Beteiligung von miRNAs an der Regulation retrograder Signalgebung.

Verglichen mit den Signalen, die anhand der Literaturrecherche als Regulatoren des Kernantwortmoduls identifiziert wurden, sind Auxin und ABA in den Kategorien vertreten. Die Kategorie *Dissaccharid metabolischer Prozess* deutet auf Zucker als Signal hin. Die Beteiligung der Grundmodulgene an den einzelnen Modulen ist in Tabelle A.9 aufgezeigt.

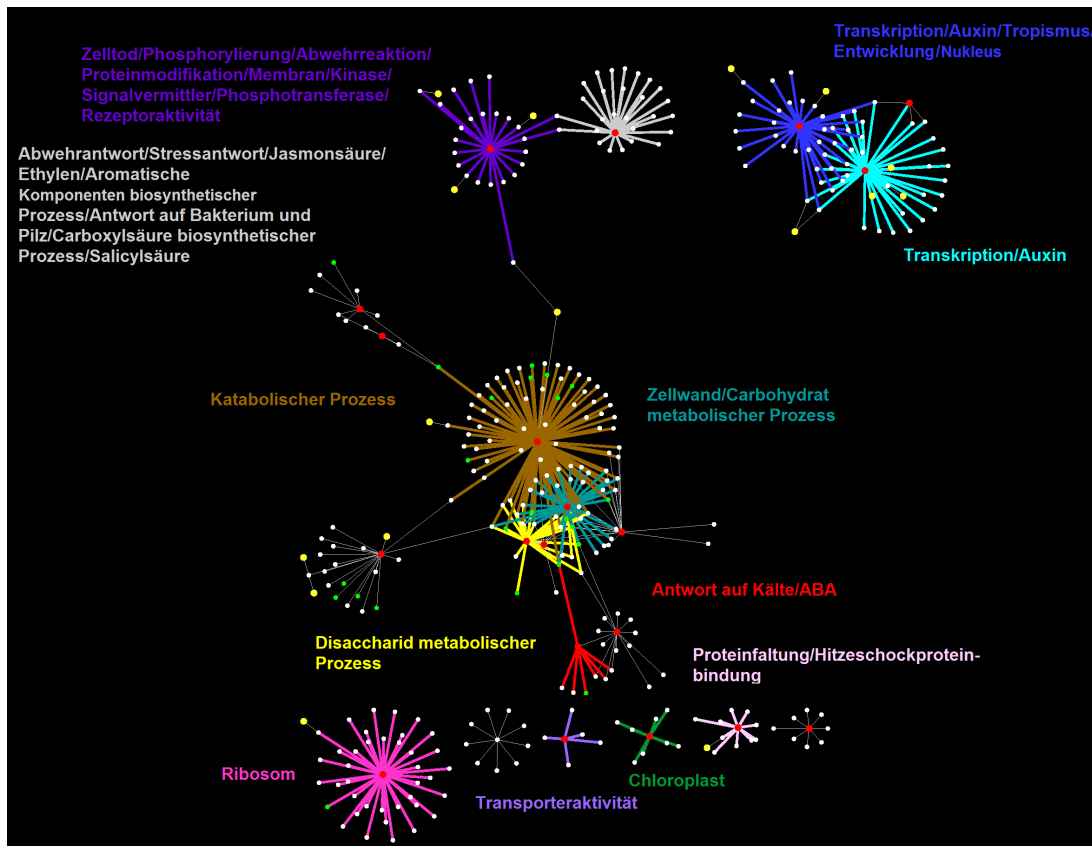


Abbildung 2.11: Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf ANAP sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern. - Rote Knoten stellen die Grundmodulgene, gelbe Knoten die miRNAs dar. Gruppen, deren Gene angereicherte GO-Terme zu einer bestimmten Kategorie gehörig zeigen, sind farbig dargestellt.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

2.3.6.3 Netzwerk basierend auf AraNet

ANAP inkorporiert den Y2H-Datensatz und ist somit nicht komplett unabhängig von diesem. Daher wurde nach einer weiteren Alternative gesucht, um die Einbettung des Kernantwortmoduls in zelluläre Netzwerke aufzuzeigen. AraNet [Lee et al., 2010] ist im Gegensatz zu den bisher verwendeten Interaktomen ein probabilistisches Netzwerk und inkorporiert neben Datenbanken, die auch von ANAP genutzt werden, eine Vielzahl weiterer Datensätze exklusive des Y2H-Interaktoms über Proteininteraktionen (mRNA Koexpression; IntAct [Aranda et al., 2010]; BIND [Bader et al., 2003]; TAIR [Swarbreck et al., 2008]; Interaktionskarte von MADS-Box Transkriptionsfaktoren; Proteinsequenzen; phylogenetische Ähnlichkeit; bakterielle/archaebakterielle Homologien; Gen-Gen-Assoziationen von Hefe, Fliege, Wurm und Mensch basierend auf Orthologien). Es besteht aus 19 647 Interaktoren mit 1 062 222 Interaktionen. Es wird, ebenso wie bei ANAP, auf Grund der hohen Netzwerkabdeckung angenommen, dass etliche Stimuli in den Modulen und die Grundmodulgene entweder vollständig oder größtenteils erfasst werden. Die Erwartung an die Komplexität der Module ist, dass auch hier hohe Interferenzen auftreten, eventuell sogar ausgeprägter als bei ANAP auf Grund der höheren Interaktionsanzahl und Interaktoren.

Von den Grundmodulgenen sind bis auf die Gene AT4G28270, AT5G64640 und AT3G44450 alle in AraNet enthalten, sodass ein Netzwerk basierend auf diesen und ihren jeweils direkten Interaktionspartnern aufgebaut werden konnte (s. Tabelle C12). Nach Gruppierung der Interaktionen mit *linkcomm* verblieben 33 der 39 Grundmodulgene im Subnetzwerk, welches aus 2497 Interaktionen und 2089 Proteinen bestand (s. Tabelle C13). An diesem Netzwerk sind ebenfalls miRNAs, insgesamt 92 (s. Tabelle A.10), beteiligt.

Nach Filterung der Verknüpfungsgruppen wie in 2.3.6 beschrieben wurden 29 mithilfe der GO-Anreicherungsanalyse untersucht und die Terme pro Gruppe kategorisiert (vgl. Tabelle C14). Die Kategorien der Verknüpfungsgruppen zeigen stärkere Interferenzen (vgl. Tabelle A.11) als die der Netzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom und ANAP. Gruppen, die sehr vielfältige Kategorien vertreten, wurden unter *Verschiedene* zusammengefasst (vgl. Tabelle C13). Die Kategorien dieser Gruppen finden sich jedoch in anderen Gruppen wieder (vgl. Tabelle C14), sodass kein Informationsverlust durch

2. ERGEBNISSE

diese Verallgemeinerung zu befürchten ist. Zur besseren Übersicht sind nur solche Gruppen farblich dargestellt, die klarer abgegrenzte Kategorien anhand ihrer angereicherten GO-Terme darstellen (vgl. Tabelle A.11, s. Abbildungen 2.12 und 2.13). Auffallend ist, dass eines der Grundmodulgene, AT1G11260 (STP1) den ausgeprägtesten Hub mit 644 Interaktionspartnern darstellt (s. Abb. 2.12, vgl. Abb. B.4). Zur besseren Visualisierung wurde er weggelassen (s. Abb. 2.13). Neben starken Mischkategorien treten Kategorien wie *Transkription*, *Auxin*, *Translation* und *ABA* in Erscheinung. Im Vergleich zum Netzwerk basierend auf ANAP (vgl. 2.3.6.2) tritt auch hier wieder die Kategorie *Verteidigungsreaktion* sowie *Jasmonsäure* und *Salicylsäure* auf, hier allerdings in Verbindung mit *Ethylen*, *Gibberellin*, *ABA*, *Auxin*, *Transkription* und *Kälte*. Im Vergleich zu beiden vorangegangenen Netzwerken treten jedoch auch Kategorien in Erscheinung, die bei diesen Netzwerken nicht vertreten waren. So z.B. *FAD-Bindung* im Zusammenspiel mit *Alkoholmetabolismus*, *Endomembran* als Kompartiment, *Carbon-Carbon-Lyase*, *Oxidoreduktase* und *Purinnukleosidbindung*.

Die Signale Auxin und ABA, die das Kernantwortmodul induzieren, sind in den Kategorien vertreten. Zucker-Signale sind durch die Kategorien *Trehalose Metabolismus* oder *Zuckerbindung* vertreten.

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

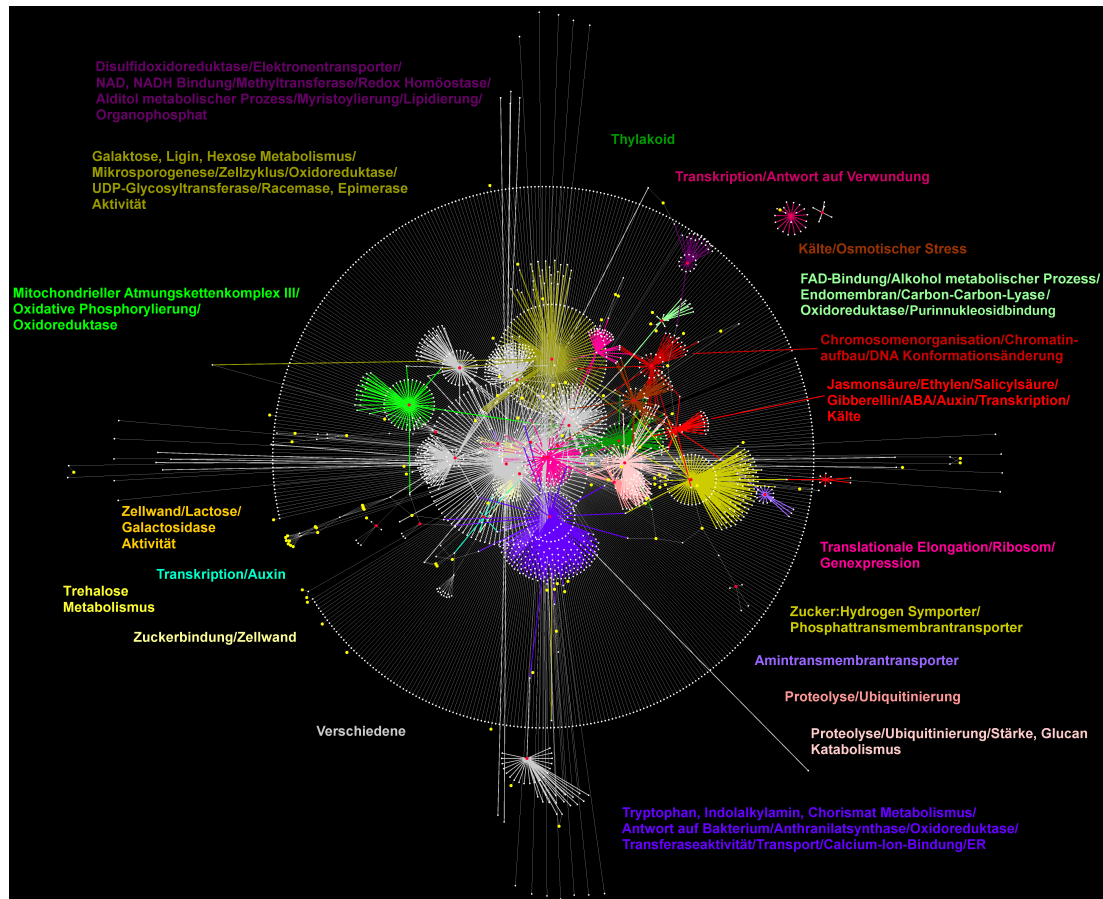


Abbildung 2.12: Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgengen und ihren direkten Interaktionspartnern, mit STP1. - Rote Knoten stellen die Grundmodulgene, gelbe Knoten die miRNAs dar. Farblich dargestellt sind solche Gruppen, die angereicherte GO-Terme zugehörig zu einer bestimmten Kategorie zeigen. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Der Hub STP1 (AT1G11260), eines der Grundmodulgene, wurde im Netzwerk belassen.

2. ERGEBNISSE

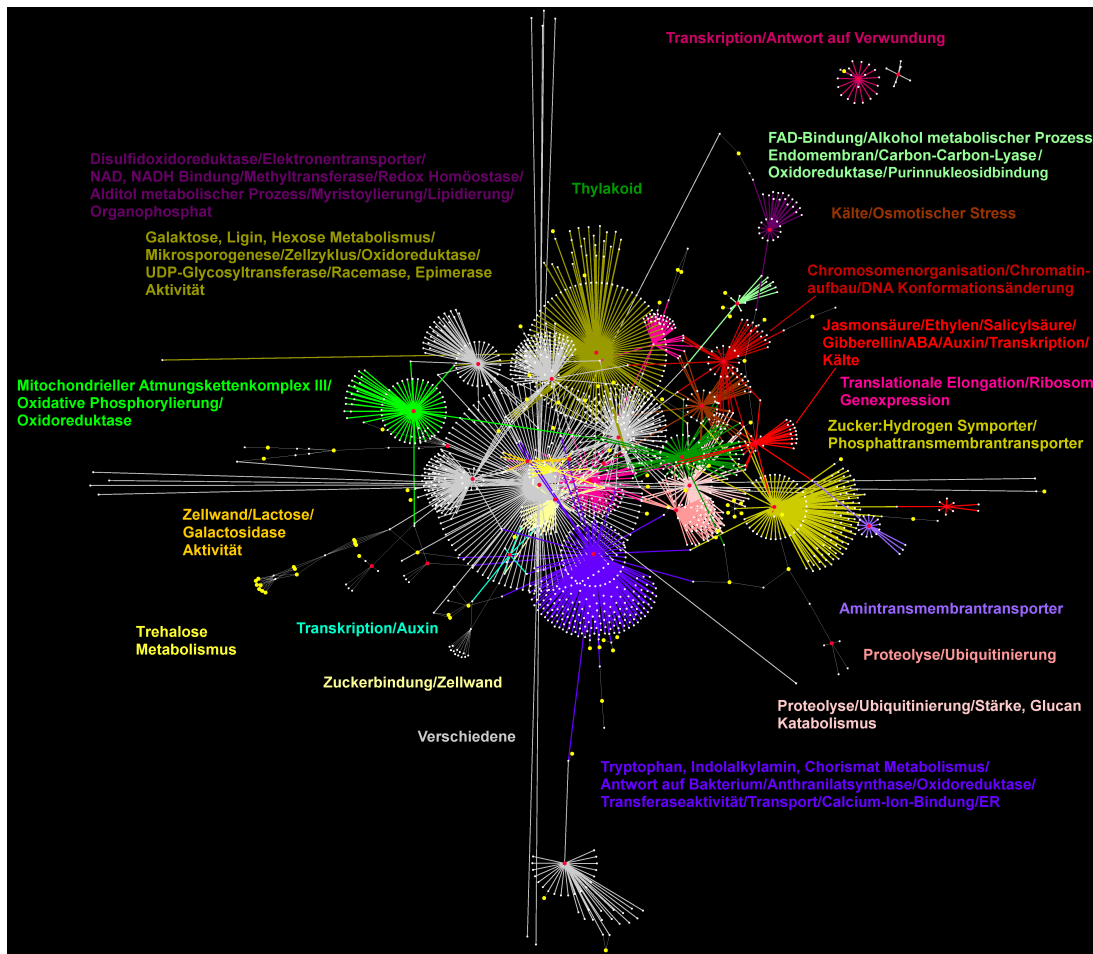


Abbildung 2.13: Darstellung des Subnetzwerkes, basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenden und ihren direkten Interaktionspartnern ohne STP1. - Rote Knoten stellen die Grundmodulgene, gelbe Knoten die miRNAs dar. Farblich dargestellt sind solche Gruppen, die angereicherte GO-Terme zugehörig zu einer bestimmten Kategorie zeigen. ER: Endoplasmatisches Reticulum. Zur besseren Übersicht wurde der Hub STP1 (AT1G11260), eines der Grundmodulgene, entfernt.

2.3.6.4 Abschließende Betrachtung der PPI-Netzwerke basierend auf dem Grundmodul

Alle Subnetzwerke sind typische biologische Netzwerke mit wenigen Hubs und vielen gering verknüpften Knoten bzw. Proteinen [Barabási und Oltvai, 2004] (vgl. Abbildungen B.2, B.3, und B.4). Auffällig ist, dass nur wenige Verknüpfungsgruppen aller untersuchten Netzwerke eine Dichte über Null zeigen (s. Tabellen C7, C10, C13). Die Dichte gibt hierbei an, wie stark eine bestimmte Gruppe von anderen Gruppen getrennt ist. Eventuell spielt hier die Struktur der Netzwerke eine tragende Rolle, wie in 3.5 diskutiert.

Da die Interaktome nicht vollständig voneinander abhängig sind, sondern sich ergänzen und eine unterschiedliche Größe in Bezug auf die Summe ihrer Interaktoren und Verbindungen aufweisen, ist zu erwarten, dass einige Kategorien spezifisch für ein bestimmtes Subnetzwerk sind. Betrachtet man die Kategorien, die in den einzelnen Subnetzwerken vertreten sind, so zeigen sich hier überwiegend Kategorien, die auf verwandte biologische Prozesse und Signalpfade schließen lassen. Diese Beobachtung deckt sich mit der eingangs beschriebenen Annahme (vgl. 2.3.6), dass die Module trotz unterschiedlicher Datenlage ähnlich sein sollten, da sie mit dem gemeinsamen Modul der retrograden Signalgebung über die Grundmodulgene verknüpft sind. Zum besseren Vergleich wurden Mischkategorien aufgebrochen und die verschiedenen Subnetzwerke auf das Vorhandensein dieser Unterkategorien untersucht und nach biologischer Prozessähnlichkeit gruppiert (komplette Auswertung s. Tabelle A.12, vgl. Abb. 2.14 A). Allen Subnetzwerken gemein sind Prozesse verbunden mit Transkription, Translation, Auxin, Transport, Wachstum, Stress, Proteinmodifikation, Phosphorylierung sowie chloroplastidäre Prozesse (vgl. Abb. 2.14 A, Tabelle A.12). Die Identifikation von Modulen in allen Netzwerken, die Transkription und Translation als Prozess reflektieren, spiegelt die veränderte Transkription und Translation nukleär kodierter Gene durch retrograde Signale wider. Nicht bei allen Subnetzwerken vertreten sind Kategorien, die Prozesse der Komponentenorganisation, die Bindung von Calcium, Abwehrreaktionen, Signalgebung, den Elektronenpool, Zucker, das Mitochondrium, Ethylen, die Zellwand und die Redox Homöostase betreffen. Calcium und Zucker sind jedoch in den Grundmodulgenen vertreten, sodass sich hier die unterschiedlich starke Abbildung des gesamten PPI-Netzwerkes in *A. thaliana* und der darin enthaltenen Signalmodule widerspiegelt.

2. ERGEBNISSE

Die Ausprägung der einzelnen Subnetzwerke im Bezug auf die Module ist, betrachtet man den Unterschied von 28 Kategorien bzw. Prozessen, die netzwerkspezifisch sind, stärker als angenommen und eventuell auf die unterschiedliche Netzwerkabdeckung der Protein-Protein-Interaktionen in *A. thaliana* zurückzuführen.

Bei allen Subnetzwerken nehmen die Grundmodulgene hauptsächlich an solchen Modulen teil, die ihrer Beschreibung nach TAIR9 entsprechen (vgl. Tabelle A.13). Beispielsweise ist das Grundmodulgen AT3G23030 (IAA2) in allen drei Subnetzwerken mit Modulen in Verbindung, die Auxin als Signal widerspiegeln und bei der Transkription eine Rolle spielen. Ein weiteres Beispiel ist das Gen AT2G15890 (MEE14), welches in AraNet an einem Modul der Kategorie *Chloroplast* teilnimmt und auch als eines der wenigen Proteinprodukte im Chloroplasten anzufinden ist (vgl. Tabelle A.3). Jedoch sind auch Grundmodulgene über die Subnetzwerke an verschiedenen Modulen beteiligt. Ein Beispiel dafür ist AT1G63180 (UGE3), welches bei ANAP in einem Modul beteiligt ist, das chloroplastidäre Prozesse widerspiegelt. Bei AraNet hingegen ist es in verschiedene Module integriert, die Zucker-Signale, Wachstumsprozesse und Redox Homöostase wiedergeben. Laut Literaturrecherche ist es jedoch nur als Zucker-induzierbar beschrieben (vgl. Tabelle A.3, Abb. 2.7). Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Interferenz verschiedener Signale, die in der Charakterisierung der Grundmodulgene anhand der Literatur bereits festgestellt wurde.

Bei allen Subnetzwerken wurden Proteine der gefilterten Verknüpfungsgruppen als Ziele von miRNAs aufgezeigt. Da die Interaktome zwar eine große Ähnlichkeit im Bezug auf die Charakterisierung einzelner Gruppen, jedoch nicht im Bezug auf die Interaktoren zeigen (vgl. Abb. B.5), war nicht zu erwarten, dass bei den Subnetzwerken die gleichen miRNAs auftreten. Die geringe Übereinstimmung zwischen den Subnetzwerken im Bezug auf die mit ihnen verknüpften miRNAs bestätigt diese Annahme (s. Abb. 2.14 B, Tabelle C15). Lediglich zwei miRNAs, ath-miR4221 und ath-miR858, sind in allen Subnetzwerken vorhanden. Sie haben verschiedene Gene wie eine RNA-Polymerase (NRPC1) oder MYB Transkriptionsfaktoren zum Ziel (s. Tabelle 2.7, vgl. Tabelle C27). Bei Netzwerken basierend auf dem Y2H-Datensatz und AraNet sind hauptsächlich miRNAs, welche sequenzähnlich sind, vorhanden. Die Vermutung, dass bestimmte Gruppen von miRNAs die einzelnen Module regulieren, liegt daher nahe. Da auch vier der Grundmodulgene (vgl. Tabelle 2.6) als Ziele von miRNAs genannt werden,

2.3 Charakterisierung eines Kernantwortmoduls retrograder Signale

erscheint es möglich, dass miRNAs bei der Ausprägung der retrograden Signalgebung eine Rolle spielen.

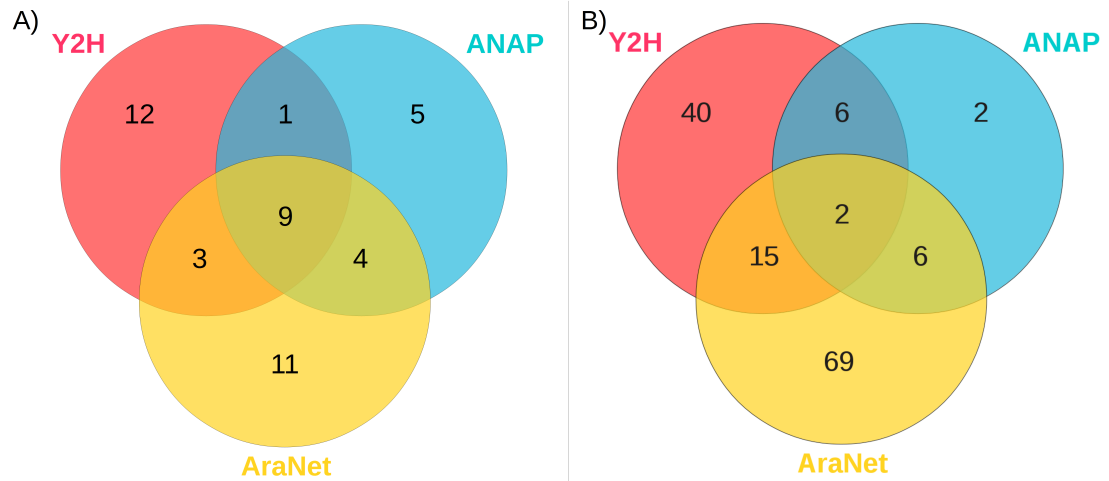


Abbildung 2.14: Übereinstimmung der Kategorien der Subnetzwerke und der mit den Netzwerken verknüpften miRNAs basierend auf Y2H-Daten, ANAP und AraNet. - A) Summe der Übereinstimmung biologischer Prozesse auf Basis der in den Subnetzwerken vertretenen Kategorien. Einige Prozesse sind netzwerkspezifisch, während neun in allen Subnetzwerken trotz deren unterschiedlicher Größe und Datengrundlage vertreten sind. B) Die miRNAs der einzelnen Netzwerke basierend auf Y2H-Daten, ANAP und AraNet wurden auf Überlappungen untersucht. Lediglich zwei miRNAs stimmen bei allen Subnetzwerken überein.

2. ERGEBNISSE

Tabelle 2.7: Zielgene der in den Netzwerken basierend auf dem Grundmodul vorkommenden miRNAs. - Die Zielgene sowie ihre Kurzbeschreibung der in den Netzwerken basierend auf dem Kernantwortmodul sowie Y2H, ANAP und AraNet vorkommenden miRNAs.

miRNA	Zielgen	Kurzbeschreibung (TAIR9)	Netzwerk
ath-miR858	AT3G49690	MYB84 (MYB DOMAIN PROTEIN 84)	Y2H
	AT4G09460	ATMYB6	
	AT1G66230	MYB20 (MYB DOMAIN PROTEIN 20)	ANAP
	AT1G71030	MYBL2 (ARABIDOPSIS MYBLIKE 2)	AraNet
ath-miR4221	AT3G54170	ATFIP37 (ARABIDOPSIS THALIANA FKBP12 INTERACTING PROTEIN 37)	Y2H
	AT3G14200	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	ANAP
	AT2G33240	XID (MYOSIN XI D)	AraNet
	AT5G60040	NRPC1 (NUCLEAR RNA POLYMERASE C1)	

2.4 Laterale Module

Die vorangegangenen Analysen basierten auf dem Grundmodul, das aus 39 differenziell regulierten Genen in allen sechs Experimenten bestand. Es zeigte somit eine geringe Größe. Um Module der retrograden Signalgebung auf einer breiteren Basis zu betrachten und tiefergehende Einblicke in diese zu erhalten, wurden zusätzlich Gene, die in mindestens drei Experimenten differentiell exprimiert waren, betrachtet. Diese wurden nach ihrer Expressionsrichtung und -stärke mit dem *kmeans*-Algorithmus [Hartigan und Wong, 1979] geclustert (vgl. 5.7). Im Vergleich zu anderen Cluster-Algorithmen wie z.B. dem *Chinese Restaurant Clustering* [Qin, 2006] liefert *kmeans* ähnliche Clusterstrukturen, jedoch in wesentlich kürzerer Rechenzeit. Der Nachteil, dass die Clustersumme vom Benutzer bestimmt werden muss, kann durch ein Scree-Test [Crimin et al., 2007] ähnliches Verfahren ausgeglichen werden. Dieses wurde zur Bestimmung der Idealsumme der Cluster herangezogen. Ähnlich dem Scree-Test lieferte es einen Plot, der bei der Idealsumme der Cluster einen Knick (*Ellenbogen*) zeigte. Jedoch sind die resultierenden Cluster nicht deutlich voneinander getrennt (vgl. Abb. B.6 A) und auch die Screeplots lieferten eine ungenaue Abbildung des Knicks (vgl. Abb. B.10), sodass nach einem Kompromiss zwischen klar voneinander abgegrenzten Clustern und einer maximalen Summe an Clustern gesucht wurde, um mögliche Signalketten präzise voneinander trennen zu können. Dieser Kompromiss wurde bei 15 Clustern unterschiedlicher Größe erreicht (vgl. Abb. B.6 B, s. Tabelle C16). Die Cluster beinhalten ein Minimum von 86 Genen (Cluster 1) und ein Maximum von 668 Genen (vgl. Tabelle C16) und werden im Folgenden als Basis für die nachfolgenden Analysen genutzt. Ihre Charakteristika und Einbettung in zelluläre Signalnetzwerke werden als laterale Antwortmodule oder auch laterale Module, bezeichnet.

2. ERGEBNISSE

2.4.1 Promoterelemente der lateralen Module

Da die Analyse der Schnittmengen des Venn Diagramms nur unzureichende Informationen über regulatorische Elemente liefern konnte (vgl. 2.3.3), wurden die Gene jedes Clusters mithilfe von FIRE, wie in 2.3.3 beschrieben, auf *cis*-Elemente untersucht. Anhand der Netzwerkanalyse basierend auf den Grundmodulgenen zeigte sich, dass etliche Module wie Transkription, Abwehrreaktion oder Stress der retrograden Signalkette angeschlossen sind. Auch die Charakterisierung des Grundmoduls zeigte verschiedene Signale wie Zucker und ABA. Da die lateralen Module diesem Modul angeschlossen sind, sollten sich solche Signale und Signalpfade in den regulatorischen Elementen wiederfinden lassen. Die vollständigen Ergebnisse sind in Abbildung B.7 dargestellt.

Neben 14 Motiven, die nicht in der JASPAR-Datenbank [Sandelin et al., 2004] bekannt sind (vgl. Abb. B.7), wurden einige Motive identifiziert, die mit ABA-Signalen in Verbindung stehen (vgl. Abb. 2.15). Eines dieser Motive ist ABREATRD22 mit der identifizierten Sequenz GCAC. Es wurde erstmals als ein ABA-assoziiertes Motiv im Gen *responsive to desiccation 22* (*rd22*), das auf Austrocknen reagiert [Iwasaki et al., 1995], beschrieben. Auch wurde es im Zusammenhang mit Pfaden, die abiotischem Stress entgegenwirken, beschrieben [Li et al., 2006]. ABREATRD22 wird durch die Transkriptorfamilien MYB und MYC erkannt [Abe et al., 1997]. Das Motiv ATMYC2-RD22 ([A|C|G]ACATG beim K-mer 5, [A|G|T][A|C][C|G]CATGTG beim K-mer 8) steht ebenfalls mit dem Gen *rd22* in Verbindung. Dieses Motiv wird von Transkriptionsfaktoren der Familie MYC gebunden [Abe et al., 1997]. Einige dieser Transkriptionsfaktoren sind an ABA-regulierter Genexpression bei Trockenheits- und Salzstress beteiligt [Abe et al., 2003]. Daher könnte das Motiv ATMYC2-RD22 möglicherweise auch in Relation zu ABA-Signalen stehen. Ein weiteres, mit ABA assoziiertes Motiv ist ABRE-like mit der Sequenz [A|G|T][A|C]CACGT[G|T][A|G|T]. Es ist an der ABA-medierten Antwort auf Trockenheit beteiligt [Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993; Simpson et al., 2003] und wird von G-Box Proteinen der bZip-Familie gebunden [Giraudat et al., 1994]. Auch das Motiv ATHB6 binding site motif (AATAATA), welches im Promoter von ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 6 (ATHB6) vorkommt, reflektiert ABA-Signale. Es wurde im Zusammenhang mit der Reaktion auf osmotischen Stress, auf Trockenheit und auf ABA-Signale, vermittelt durch die Proteinphosphatase ABA INSENSITIVE 1 (ABI1), beschrieben

[Söderman et al., 1999; Himmelbach et al., 2002]. Auch die W-Box WBOXATNPR1 mit der Sequenz A[A|T]GTTGAC fällt in die Gruppe der Motive, die einen ABA-Signalfad reflektieren. Dieses Motiv wurde in Promotoren von Genen, die auf ABA sensitiv sind, in *Oryza japonica* beschrieben [Yazaki et al., 2003]. Es ist im Promoter des Proteins NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1 (NPR1) vorhanden und ist daher auch an der Abwehrreaktion beteiligt [Després et al., 2003]. W-Boxen werden durch WRKY Transkriptionsfaktoren erkannt [Eulgem et al., 2000].

Eine weitere Gruppe von Motiven steht mit Licht als Signal in Verbindung. So identifizierte FIRE das Motiv CGF1ATCAB2 mit der Sequenz [A|T]TGGATAA[A|C]. Dieses Motiv trat bereits bei der Analyse regulatorischer Elemente des Kernantwortmoduls auf (vgl. 2.3.3) und beinhaltet eine lichtsensitive konservierte I-Box [Terzaghi und Cashmore, 1995]. Die I-Box selbst ([C|G|T]C[C|T]TATCC beim K-mer 7, CTTATC[C|T][A|G|T] beim K-mer 8) wurde ebenfalls identifiziert und wird in den Promotoren von Genen gefunden, die Chlorophyll a/b bindende Proteine kodieren [Donald und Cashmore, 1990]. Auch tritt dieses Motiv bei Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCo) Genen auf. Die Gruppe der Motive, die mit Licht als Signal in Verbindungen stehen, schließt das Motiv HEXAT mit der Sequenz [A|C|T]CACG[G|T]C[A|T][C|G|T] ab. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte G-Box, die als regulatorisches Element im Zusammenhang mit Licht-Signalen beschrieben wurde [Weisshaar et al., 1991; Jiao et al., 2007]. Dieses Motiv ist eine Bindestelle für TGA1, benannt nach seiner Bindesequenz TGACG [Després et al., 2003], und für den G-BOX BINDING FACTOR 1 (GBF1). Beide gehören der Leucin-Zipper Klasse an [Schindler et al., 1992].

Das Motiv Telo-Box 1 ([A|G|T]AA[A|G]CCCTA beim K-mer 7, [A|G|T]AA[A|G]CCCTA[A|C|G] beim K-mer 8) gehört zu keiner der beiden Gruppierungen. Erstmals beschrieben wurde das Motiv als charakteristische Sequenz der ELONGATION FACTOR 1-a Gene [Axelos et al., 1989] und ist homolog zu den telomerischen Repeats in höheren Eukaryoten. Es interagiert mit der Kernmatrix [Curie et al., 1993] und ist an der Aktivierung der Genexpression beteiligt [Tremousaygue et al., 1999]. Des Weiteren wurde die Sequenz des Motives als ein zentrales Motiv bei Zucker-Signalen beschrieben [Li et al., 2006]. Eine Aufstellung, welche Fraktion der Gene ein bestimmtes Motiv zeigen, ist in Tabelle A.14 gezeigt.

Betrachtet man zusätzlich die Über- und Unterrepräsentierung der Motive bei den

2. ERGEBNISSE

einzelnen Clustern, so fällt auf, dass die meisten Cluster sowohl Motive, die im Zusammenhang mit ABA stehen könnten, als auch solche, die mit Licht im Zusammenhang stehen könnten, überrepräsentiert zeigen. Diese Beobachtung könnte die starke Interferenz zwischen ABA- und Licht-Signalpfaden reflektieren [Galvez-Valdivieso et al., 2009; Garcia-Mata und Lamattina, 2007; den Os et al., 2007]. Des Weiteren fällt auf, dass die Cluster 5 und 14 bei allen Motiven bis auf das Motiv Telo-Box1 eine signifikante Unterrepräsentierung zeigen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den lateralen Modulen ein von den übrigen Signalwegen abgegrenzter Zucker-Signalpfad existiert. Wie eingangs angenommen zeigen sich Signale, die bereits in der Charakterisierung des Grundmoduls und in den ihm angeschlossenen Modulen des zellulären Signalnetzwerkes anhand von Proteininteraktionen identifiziert wurden. ABA wurde anhand der Literaturrecherche identifiziert, ebenso Zucker. Transkription als solche wurde in den Modulen der Signalnetzwerke identifiziert, ebenso Abwehrreaktionen. Das Element CGF1ATCAB2 als I-Box findet sich auch als regulatorisches Element im Grundmodul wieder. Die identifizierten Motive werden durch verschiedene Transkriptionsfaktorfamilien gebunden. Einige Vertreter dieser Familien sind in mindestens drei Experimenten differenziell exprimiert (s. Tabelle A.15). Diese könnten an den regulatorischen Elementen binden.

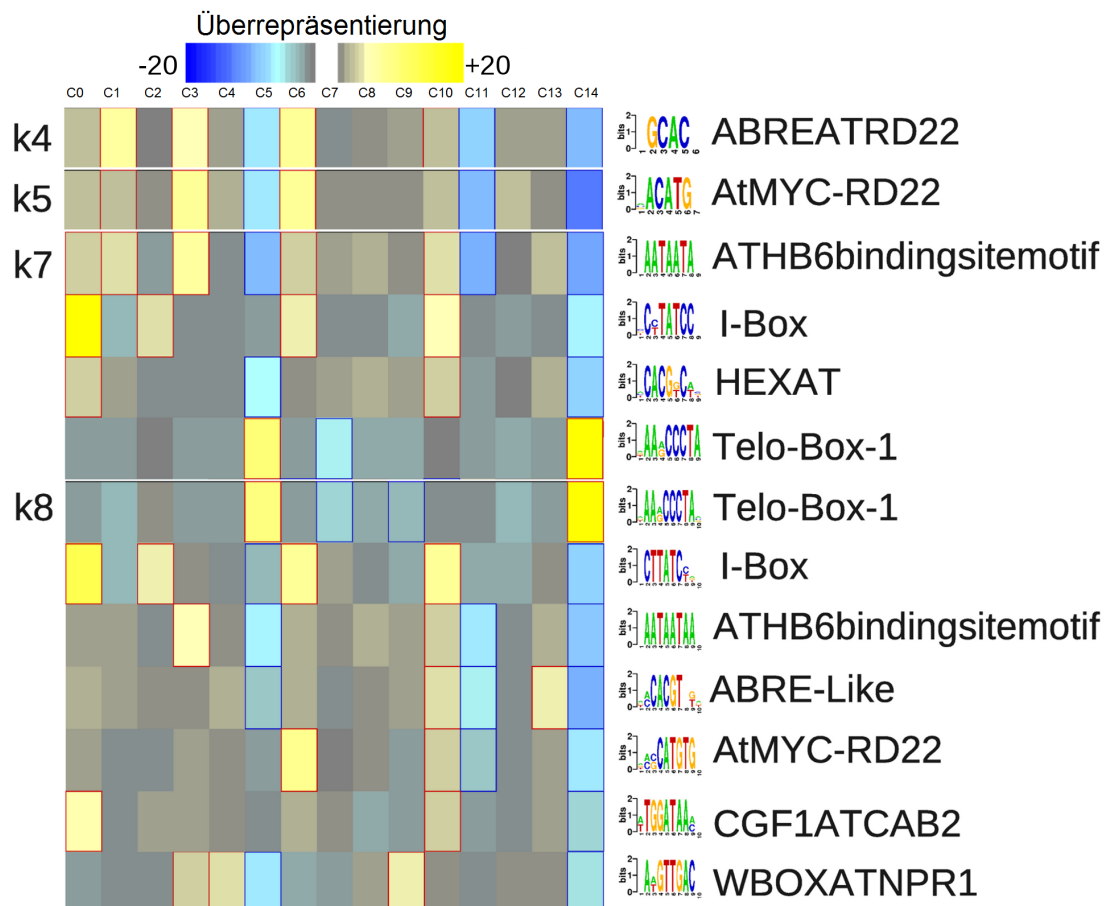


Abbildung 2.15: Darstellung der FIRE Ergebnisse für die Gene, welche die laterale Module ausbilden. - Für jeden Cluster (benannt als C0 bis C14) wurden Motive mit K-mer-Größen von 3 bis 8 gesucht (links). Die Motive sind entweder in gelb (Überrepräsentierung) oder in blau (Unterrepräsentierung) markiert. Die Sequenz sowie der Name jedes Motivs sind rechts dargestellt. Nur Motive, die in der JASPAR-Datenbank bekannt sind, sind aufgezeigt. Um die Information, welcher Cluster ein bestimmtes Motiv bei verschiedenen K-mer-Größen zeigt, zu wahren, sind die Ergebnisse aller K-meren hier dargestellt.

2. ERGEBNISSE

2.4.2 Charakterisierung lateraler Module anhand von GO-Anreicherungsanalysen

Die regulatorischen Elemente lieferten einen ersten Einblick in die Regulation der lateralen Module. Um Signalfade, die in den lateralen Modulen vertreten sind, zu untersuchen, wurde eine GO-Anreicherungsanalyse für jeden Cluster durchgeführt. Diese berechnet angereicherte Terme in den jeweiligen Clustern im Bezug auf die Gesamtheit aller Gene auf dem AffymetrixTM ATH1 Chip (vgl. 2.3.2, 5.6). Um eine bessere Übersicht zu erreichen, wurden die Terme pro Cluster (s. Tabelle C17) zu solchen reduziert, die entweder einen Kindterm oder eng verknüpfte Terme darstellen (s. Tabelle C18). Anschließend wurden diese Terme kategorisiert (s. Tabelle C18). Da auch hier, wie in der Charakterisierung des Kernantwortmoduls gezeigt (vgl. 2.3.2), starke Interferenzen zwischen den einzelnen Clustern auftraten, wurden die Kategorien zunächst unabhängig von den Clustern betrachtet und ihre Häufigkeit über die Cluster ermittelt (s. Abb. 2.16).

Die Ergebnisse sind ähnlich denen der vorangegangenen Analysen. Bei der *cis*-Element-Analyse der lateralen Module wurden ABA-regulatorische Elemente ebenso wie Abwehrreaktion-, Licht- und Zucker-assoziierte Elemente beschrieben, ebenso ein Element, welches bei der Einleitung der Transkription eine Rolle spielt (Telo-Box1). Dementsprechend finden sich in der GO-Anreicherungsanalyse die Kategorie *Hormonantworten*, unter die Terme mit Bezug zu ABA (*abscisic acid mediated signaling pathway*), Gibberellin (*response to gibberellin stimulus*), Jasmonsäure (*jasmonic acid biosynthetic process*) und Ethylen (*response to ethylen stimulus*) fallen. ABA wurde ebenfalls in der Charakterisierung des Grundmoduls und den Modulen der darauf aufbauenden Netzwerke identifiziert. Die Kategorien *Transkription* und *Translation* treten, verteilt über verschiedene Cluster, am häufigsten auf und reflektieren die Telo-Box1. Die Kategorie *Zucker*, hier als zweithäufigste Kategorie, spiegelt ebenfalls die Telo-Box1 wider, die als regulatorisches Element von Zucker-Signalen beschrieben wurde. Auch Zucker wurde mehrfach in den Analysen basierend auf dem Grundmodul als Signal gefunden. Nachfolgend ist die Kategorie Licht, das als Signal bei den regulatorischen Elementen durch die Elemente I-Box, HEXAT und CGF1ATCAB2 vertreten ist. Die Kategorie *Verwundung und Abwehr* steht mit dem Element WBOXATNPR1 in Verbindung und

wurde in den Modulen der Netzwerke, die auf den Genen bzw. Proteinen des Grundmoduls aufbauen, erfasst. Terme, die zu keiner der dargestellten Kategorien zugehörig sind, wie beispielsweise *plasma membrane*, wurden unter *Verschiedene* zusammengefasst (vgl. Tabelle C18).

Im Vergleich mit der *cis*-Element-Analyse basierend auf den lateralen Modulen zeigen Cluster, die für ein bestimmtes Motiv überrepräsentiert sind, Terme einer damit nicht direkt in Verbindung stehenden Kategorie. Beispielsweise zeigen Cluster, deren Gene in ihren Promotoren überrepräsentiert ein ABA-Element besitzen, angereicherte Terme, die hauptsächlich mit Transkription in Verbindung stehen (bspw. Cluster 1). Hier zeigt sich die vielfach beobachtete Interferenz der einzelnen Signale, die in den vorangegangenen Analysen beobachtet wurde.

Die übrigen Kategorien lassen zwar nicht direkt auf ein Signal schließen, können allerdings in Relation gesetzt werden und so auf bestimmte Signale Rückschlüsse liefern. So kann die Kategorie *Pigmente* mit Licht-Signalen in Verbindung stehen. Die Kategorie *Stress* kann mit ABA zusammenhängen, da dieses ein bekannter Übermittler von Stress-Reaktionen ist [Fujita et al., 2005; Vartanian et al., 1994]. Die Kategorie *Verwundung und Abwehrreaktion* könnte mit Jasmonsäure, welche in der Kategorie *Hormone* enthalten ist, in Verbindung stehen. Wenn man annehmen kann, dass ABA und Auxin, das im Grundmodul und den Netzwerken als Signal beobachtet wurde, in Wechselwirkung über Ethylen Wachstumsprozesse ausprägen können [Hansen und Grossmann, 2000], kann man die Kategorie *Wachstum und Entwicklung* mit diesen beiden Hormonen und auch Ethylen, enthalten in der Kategorie *Hormone*, in Verbindung setzen.

2. ERGEBNISSE

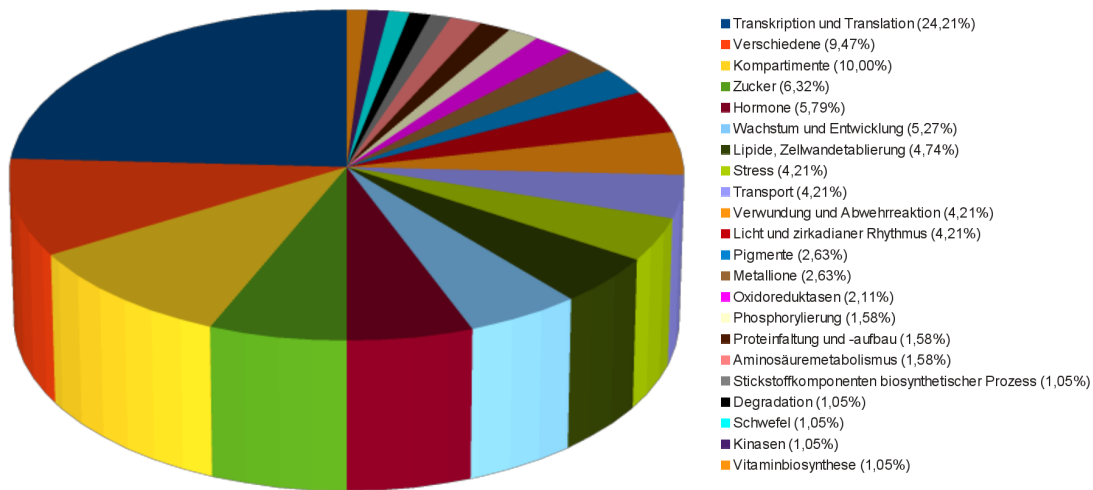


Abbildung 2.16: Darstellung der Häufigkeit von Kategorien angereicherter GO-Terme in lateralen Modulen. - Die prozentuale Häufigkeit einer bestimmten Kategorie errechnet sich aus der Gesamtanzahl der Terme, die einer bestimmten Kategorie angehören, bezogen auf die Gesamtzahl aller angereicherten Terme.

2.4.3 Charakterisierung lateraler Signalpfade und metabolischer Pfade mithilfe verschiedener Datenbanken

Da eine GO-Anreicherungsanalyse lediglich Hinweise auf an den lateralen Modulen beteiligten Pfaden, metabolischer oder signalgebender Art, geben kann, wurde zusätzlich jeder Cluster mithilfe der Pfadanalyse-Werkzeuge KEGG Spider [Antonov et al., 2008], R Spider [Antonov et al., 2010] und PPI Spider [Antonov et al., 2009] untersucht. Hierbei verbindet KEGG Spider, basierend auf der KEGG Datenbank [Kanehisa und Goto, 2000] Gene, die in Reaktionen mit gemeinsamen Substraten involviert sind. R Spider hingegen verbindet das Netzwerk aus KEGG mit dem Signalnetzwerk der Reactome Datenbank [Matthews et al., 2009]. PPI Spider basiert auf der IntAct Datenbank [Kerrien et al., 2006; Aranda et al., 2010]. Die Verwendung aller drei Werkzeuge erzielt daher eine möglichst breite Abdeckung überrepräsentierter Pfade in den Clustern. Alle Werkzeuge, die auf Bioprofiling als Online-Version verfügbar sind [Antonov, 2011], wurden mit Standardeinstellungen verwendet (vgl. 5.9). Als statistisch signifikant wurden solche Ergebnisse betrachtet, die einen P-Wert von $\leq 0,05$ aufweisen.

Bei 10 von 14 Clustern wurden angereicherte Pfade identifiziert (vgl. Tabelle C19). Die Signal- oder metabolischen Pfade wurden nach ihrer Häufigkeit in den Clustern über die verschiedenen Werkzeuge zusammengefasst und kategorisiert (s. Abb. 2.17, vgl. Tabelle A.16). Die Mehrzahl der hier identifizierten Pfade stehen mit Aminosäurenmetabolismus in Verbindung. Dem nachfolgend sind Pfade zugehörig zur Pigmentbiosynthese, Translation und Transkription. Auch sind Pfade, die mit dem Chloroplasten in Verbindung stehen, vorhanden. Dieses Ergebnis reflektiert die grundlegende Funktion plastidärer Signale als Anpassung plastidärer Funktionen. Weitere Signalpfade reflektieren Zucker-, Licht- und Hormon-Signale, darunter auch ABA und Jasmonsäure. Diese Signale wurden auch in der GO-Anreicherungsanalyse beobachtet. Metabolische Pfade, die unter die Kategorie *Redox* fallen, lassen auf Redox-Signale schließen. Eventuell sind metabolische Pfade der Zellwandmodifikation, des Fettsäuremetabolismus und Wachstums den Signalen angeschlossen. Wie in den Ergebnissen der GO-Anreicherungsanalyse beschrieben, könnten die Hormone ABA und Auxin im Wechselspiel Wachstumsprozesse steuern, die durch diese metabolischen Pfade widergegeben werden. Stress-Antworten sind mutmaßlich an Signale des Hormons ABA, Abwehrreaktionen an Jasmonsäuresignale angeschlossen. Beobachtete Pfade der Pigmentbiosynthese stehen eventuell mit Licht

2. ERGEBNISSE

als Signalgeber in Verbindung.

Analog zur vorangegangenen GO-Anreicherungsanalyse wurden ähnliche Kategorien identifiziert (s. Tabelle 2.8). Sowohl die GO-Anreicherungsanalyse als auch die Pfadanalyse mit KEGG Spider, R Spider und PPI Spider zeigen daher in den lateralen Modulen zu Grunde liegende Signal- und metabolische Pfade auf. Jedoch zeigt sich ein großer Unterschied der jeweiligen Häufigkeit einer bestimmten Kategorie. Dies könnte auf die unterschiedlichen Datenbanken und Algorithmen der jeweiligen Analysemethode zurückzuführen sein.

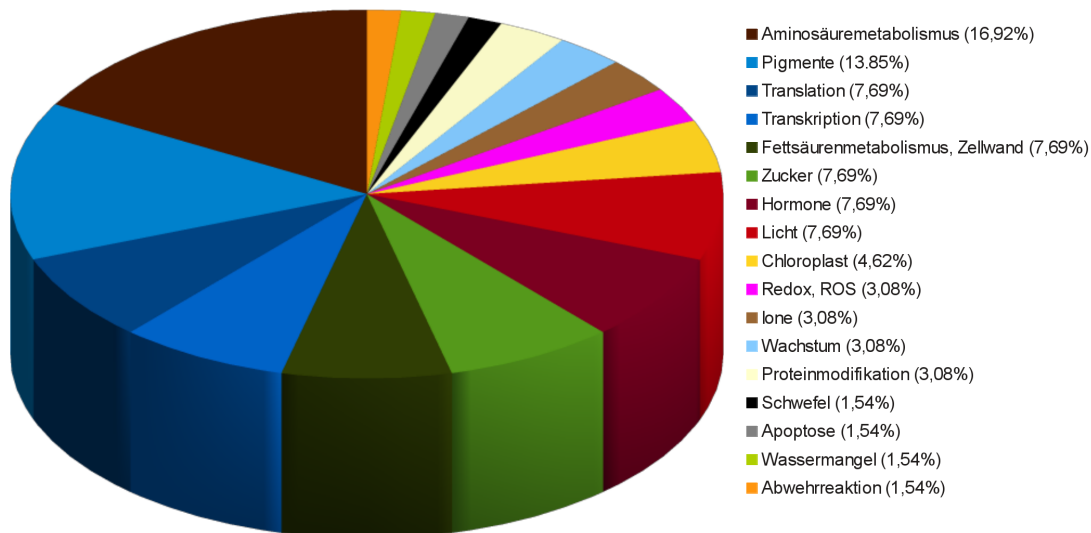


Abbildung 2.17: Darstellung der Häufigkeit einzelner Pfade über die verwendeten Pfadanalyse-Werkzeuge. - Die prozentuale Häufigkeit einer bestimmten Kategorie errechnet sich aus der Gesamtanzahl der Terme, die als zu einer bestimmten Kategorie zugehörig betrachtet wurden (vgl. Tabelle A.16).

Tabelle 2.8: Ähnliche Kategorien zwischen der GO-Anreicherungsanalyse und der Pfadanalyse. - Gegenüberstellung der Kategorien, identifiziert in der GO-Anreicherungsanalyse der lateralen Module (vgl. 2.4.2) sowie deren Pfadanalyse. Kategorien, die nicht eindeutig zueinander passen, sind in Klammern dargestellt

Kategorie GO-Terme (% der vertretenden Terme im Bezug auf die Gesamtheit aller Terme)	Kategorie Pfadanalyse (% der zugehörigen Pfade im Bezug auf die Gesamtheit aller Pfade)
Aminosäuremetabolismus (1,58)	Aminosäuremetabolismus (16,92)
Pigmente (2,63)	Pigmente (13,85)
Transkription und Translation (24,21)	Translation (7,69)
Transkription und Translation (24,21)	Transkription (7,69)
Lipide, Zellwandetablierung (4,74)	Fettsäurenmetabolismus, Zellwand (7,69)
Zucker (6,32)	Zucker (7,69)
Hormone (5,79)	Hormone (7,69)
Licht und zirkadianer Rhythmus (4,21)	Licht (7,69)
Kompartimente (10,00)	Chloroplast (4,62)
Oxidoreduktasen (2,11)	Redox, ROS (3,08)
Metallione (2,63)	Ione (3,08)
Wachstum und Entwicklung (5,27)	Wachstum (3,08)
Proteinfaltung und -aufbau (1,58)	Proteinmodifikation (3,08)
(Phosphorylierung (1,58))	(Proteinmodifikation (3,08))
Schwefel (1,05)	Schwefel (1,54)
(Degradation (1,05))	(Apoptose (1,54))
(Stress (4,21))	(Wassermangel (1,54))
Verwundung und Abwehrreaktion (4,21)	Abwehrreaktion (1,54)

2. ERGEBNISSE

2.4.4 Einbettung der lateralen Module in PPI-Netzwerke

Die Pfadanalysen und GO-Anreicherungsanalysen lieferten sehr ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Signalpfade und metabolische Pfade, die in den lateralen Modulen vertreten sind. Um abschließend die Einbettung dieser Module in PPI-Netzwerke zu betrachten, wurde die bereits bekannte Y2H-Datenbank (vgl. 2.3.6.1) verwendet. Der Aufbau der Subnetzwerke basierte auf den Genen bzw. Proteinen der lateralen Module sowie ihren direkten Interaktionspartnern. Verknüpfungsgruppen wurden anschließend mit dem *linkcomm*-Algorithmus [Kalinka und Tomancak, 2011] unter Standardeinstellungen erstellt und solche, die aus mindestens 5 Proteinen bestanden, mithilfe einer GO-Anreicherungsanalyse charakterisiert (vgl. 5.6). Ebenso wie bei den Subnetzwerken basierend auf dem Grundmodul wurden die resultierenden Terme pro Modul kategorisiert (vgl. 2.3.6). AraNet und ANAP (vgl. 2.3.6.2 und 2.3.6.3) konnten jedoch nicht verwendet werden, da die Subnetzwerke basierend auf den Genen der lateralen Module und ihren direkten Interaktionspartnern mit 568 418 und 162 978 Interaktionen zu große Netzwerke lieferten, die mit dem *linkcomm*-Algorithmus nicht mehr auf Verknüpfungsgruppen hin untersucht werden konnten. Daher wurde eine andere Datenbank verwendet, EXCERBT (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/excerbt>, 2011)[Mewes et al., 2010].

Bei EXCERBT handelt es sich um eine literaturbasierte Datenbank, die Verknüpfungen zwischen Genen, Proteinen und Phänotypen durch textsemantische Analysen der in verschiedenen Literaturdatenbanken wie z.B. Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, 2010) erfassten Artikeln erstellt. Zwar beinhaltet EXCERBT auch Proteininteraktionen aus *A. thaliana*, der Fokus liegt jedoch stärker auf humanen Daten. EXCERBT konnte bei der Netzwerkanalyse des Grundmoduls nicht verwendet werden, da das Subnetzwerk basierend auf den durch die Gene des Grundmoduls kodierten Proteinen und ihren direkten Interaktionspartnern ein zu kleines Netzwerk mit nur 23 Interaktionen für weitere Analysen lieferte. Die Datenbank selbst ist mit 4 Milliarden Interaktionen jedoch sehr groß, sodass ein ausreichend großes Subnetzwerk an PPI in *A. thaliana* erwartet werden kann.

Da die vorangegangenen Analysen basierend sowohl auf den lateralen Modulen als auch auf dem Grundmodul ähnliche Ergebnisse lieferten, ist zu erwarten, dass ähnliche

Module in den Subnetzwerken basierend auf den lateralen Modulen wie in den Subnetzwerken basierend auf dem Grundmodul identifiziert werden. miRNAs sollten ebenso in den Netzwerken vertreten sein und eventuell verschiedene Module verbinden.

2.4.4.1 PPI-Netzwerk der lateralen Module basierend auf Y2H-Daten

Auf Grund der geringen Abdeckung der geschätzten Proteininteraktionen in *A. thaliana* (vgl. 2.3.6.1) wird angenommen, dass nur ein Ausschnitt der Signale, die in den vorangegangenen Analysen basierend auf den lateralen Modulen indirekt beobachtet wurden, im Subnetzwerk vertreten ist.

Von den 4895 Genen, die in mindestens drei Experiment differenziell reguliert waren, waren 720 im Y2H-Interaktom vorhanden (vgl. Tabelle C20). Nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus' mit Reduktion trivialer Verknüpfungen (vgl. 5.10) bildeten noch 488 dieser Gene bzw. Proteine ein Subnetzwerk mit 1916 Interaktionen und 1315 distinkten Interaktoren (vgl. Tabelle C21). Insgesamt sind 55 miRNAs an die relevanten Verknüpfungsgruppen angeschlossen (s. Tabelle A.17), die verschiedene Module verbinden (s. Abb. 2.18). Dass miRNAs als Verbindungsglieder verschiedener Module dienen können, zeigte sich bereits bei dem Subnetzwerk basierend auf ANAP und den durch die Gene des Grundmoduls kodierten Proteinen (vgl. 2.3.6.2). Insgesamt wurden 64 Verknüpfungsgruppen mithilfe einer GO-Anreicherungsanalyse charakterisiert. Nur solche Kategorien, die durch mindestens zwei Verknüpfungsgruppen vertreten sind, wurden grafisch dargestellt (vgl. Tabelle C22). Die angereicherten Terme (vgl. Tabelle C22) zeigen teilweise eine eindeutige Zuordnung zu den Kategorien *Translation*, *Phosphorylierung* und *Transport*, jedoch zeigt die Mehrheit der Gruppen durch die in ihnen angereicherten Terme Zugehörigkeit zu mehreren Kategorien. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die einzelnen Module eine hohe Interferenz zeigen. Analog zu den vorangegangenen Analysen, basierend auf den Grundmodulgenen (vgl. 2.3.6 ff.), treten hier bekannte Kategorien wie *Auxin/Transkription* oder *Calciumbindung/Ionenbindung* auf. Auch *Jasmonsäure* und *Salicylsäure* sind wieder in einer Kategorie vertreten.

Die Signale, welche die Gene des Grundmoduls induzieren können, sind in diesem Netzwerk nur ansatzweise vertreten. So lässt die Kategorie *Auxin/Transkription* auf Auxin als Signal schließen. Wie bei der GO-Anreicherungs- und Pfadanalyse basierend auf den

2. ERGEBNISSE

Genen der lateralen Module zeichnet sich jedoch auch Licht als Signal ab. Dies wurde ebenso in der *cis*-Element-Analyse beobachtet.

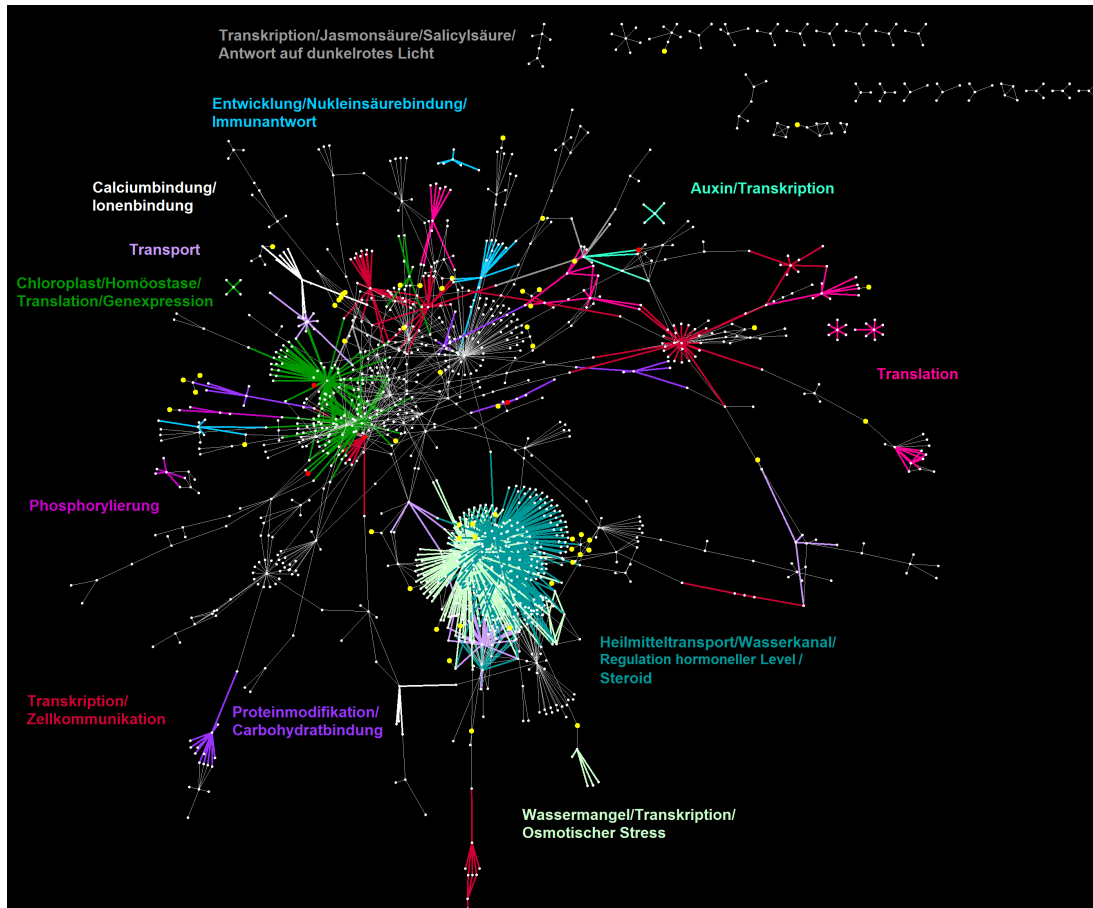


Abbildung 2.18: Darstellung des Netzwerkes aufbauend auf den Genen der lateralen Modulen sowie ihren direkten Interaktionspartnern, basierend auf dem Y2H-Datensatz - Grundmodulgene sind in rot, miRNAs in gelb hervorgehoben. Farblich markierte Verbindungen zeigen Verknüpfungsgruppen mit angereicherten GO-Termen an.

2.4.4.2 PPI-Netzwerk der lateralen Module basierend auf EXCERBT

Die EXCERBT-Datenbank ist nicht ausschließlich auf *A. thaliana* Proteininteraktionen ausgerichtet und ist im Gegensatz zu den vorherig verwendeten Interaktomen ein rein literaturbasiertes PPI-Netzwerk. Auch fehlt hier die Korrektur oder Erweiterung mit experimentell beobachteten Interaktionen, sodass ein Subnetzwerk basierend auf EXCERBT möglicherweise andere Module und Verbindungen aufzeigt als die vorherig genutzten Datenbanken. Weiterhin ist es möglich, dass andere oder auch mehr Signale als beim Y2H-Interaktom abgebildet werden, da EXCERBT eine deutlich größere Interaktomdatenbank darstellt. Dennoch sollten auch hier wieder miRNAs mit dem Netzwerk verknüpft sein, da die grundlegende Eigenschaft eines Genes als Ziel einer miRNA unabhängig von dessen Verknüpfungen zu anderen Genen oder Proteinen ist. Das Subnetzwerk basierend auf EXCERBT sowie den Proteinen der Gene der lateralen Modulen und den jeweils direkten Interaktionspartnern bestand aus 2676 Interaktionen und 1546 Interaktoren (s. Tabelle C23). 620 der insgesamt 4895 Gene, welche die lateralen Module bilden, waren vertreten. Auch hier reduzierte die Gruppierung der Verknüpfungen mit dem *linkcomm*-Algorithmus deren Anzahl auf 322 Gene, sodass das resultierende Subnetzwerk aus 1456 binären Interaktionen und 1072 Interaktoren aufgebaut war (s. Tabelle C24). Insgesamt sind 102 miRNAs an dem Netzwerk beteiligt (s. Tabelle A.18) und 111 Verknüpfungsgruppen wurden mit einer GO-Anreicherungsanalyse charakterisiert (s. Tabelle C25). Im Vergleich zum PPI-Netzwerk, welches auf dem Y2H-Datensatz basiert, sind hier stärkere Interferenzen der Kategorien und Gruppen zu verzeichnen. Für die Visualisierung des Netzwerkes (s. Abb. 2.19) wurden daher nur solche Kategorien farbig hervorgehoben, welche die geringsten Interferenzen aufzeigen. Unter *Verschiedene* sind außerdem Verknüpfungsgruppen zusammengefasst, deren Terme zu den dargestellten Kategorien zugehörig sind, sodass keine Information über Charakteristika der Module verloren ging. Module, die ähnliche Kategorien aufzeigen, sind nicht in direkter Nachbarschaft oder miteinander direkt verknüpft. Im Vergleich zu den anderen bisher untersuchten Netzwerken ist diese Eigenschaft EXCERBT-spezifisch.

Im Vergleich zum Netzwerk basierend auf Y2H-Daten sowie den Proteinen der lateralen Module sind die GO-Kategorien sehr ähnlich (vgl. 2.4.4.3). Die Kategorie *Abwehr*,

2. ERGEBNISSE

zusammen mit *Jasmonsäure*, ist im EXCERBT-Netzwerk ebenso vertreten wie *Transkription*. Betrachtet man die Signale, die im Kernantwortmodul auftraten, so sind in diesem Netzwerk Auxin, ABA sowie Zucker vertreten, nicht jedoch ROS.

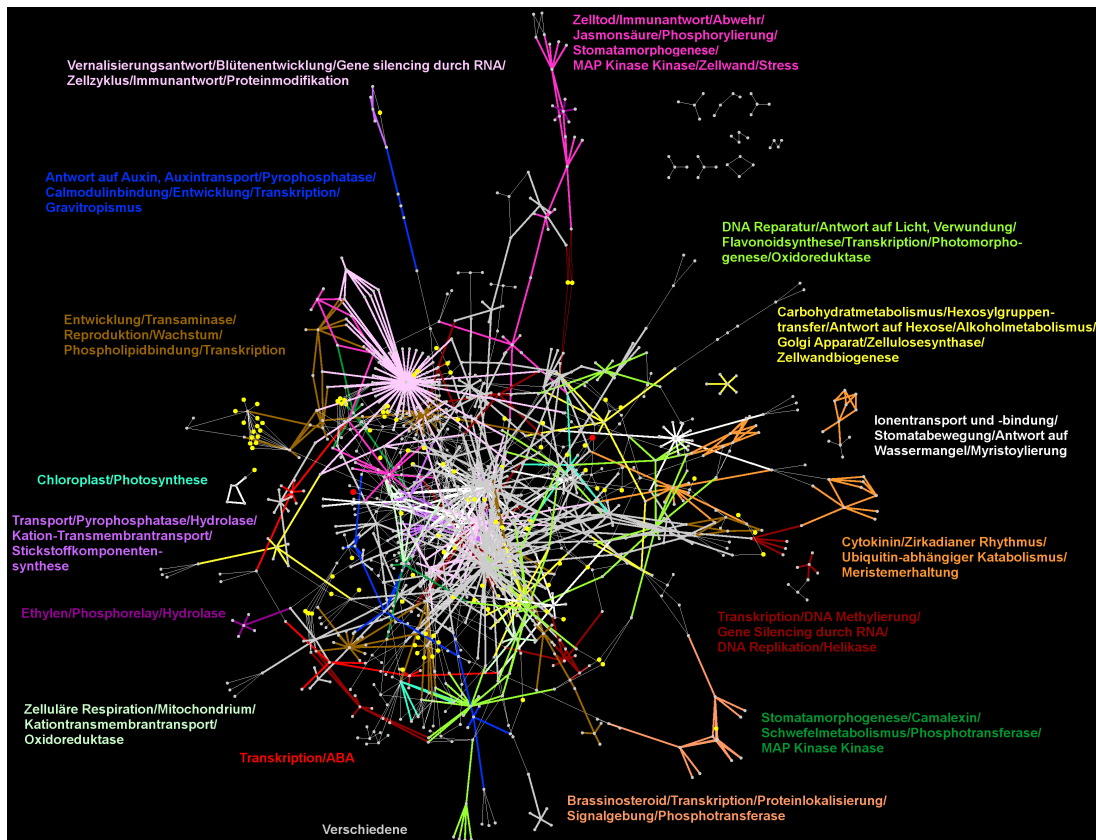


Abbildung 2.19: Darstellung des Subnetzwerkes, aufgebaut aus den Genen der lateralen Module sowie ihren direkten Interaktionspartnern, basierend auf EXCERBT - Grundmodulgene sind in rot, miRNAs in gelb dargestellt. Verbindungen, die farbig markiert sind, zeigen Kategorien angereicherter GO-Terme an.

2.4.4.3 Abschließende Betrachtung der PPI-Netzwerke der lateralen Module

Die Netzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom und EXCERBT sind, ebenso wie die Netzwerke basierend auf dem Grundmodul, typisch biologische Netzwerke mit vielen gering verbundenen Proteinen und einigen Hubs [Barabási und Oltvai, 2004] (vgl. Abbildungen B.8 und B.9). Die Verknüpfungsgruppen dieser Netzwerke zeigen, ebenso wie die Subnetzwerke basierend auf dem Grundmodul, kaum eine Dichte über Null (vgl. 2.3.6.4). Obwohl die Datenbanken sehr unterschiedlich waren, sind die Gemeinsamkeiten beider im Bezug auf die Charakterisierung der Module sehr groß (vgl. Abbildung 2.20 A). Wie bereits in 2.3.6.4 wurden die Mischkategorien zum besseren Vergleich der Netzwerke aufgebrochen und nach zu Grunde liegenden biologischen Prozessen gruppiert (s. Tabelle A.19). Obwohl beide Netzwerke auf unterschiedlichen Datenbanken basieren, zeigen sie deutliche Ähnlichkeiten bezogen auf die Zugehörigkeit ihrer Kategorien zu biologischen Prozessen. Beispiele sind die Kategorien *Transkription*, *Auxin* und *Phosphorylierung*. Auch die Kategorie *Chloroplast* ist in beiden Netzwerken vertreten.

Die Schnittmenge der mit den Netzwerken verknüpften miRNAs ist sehr groß (s. Abb. 2.20 B, Tabelle C26). Diese haben hauptsächlich Transkriptionsfaktoren zum Ziel (vgl. Tabelle A.20).

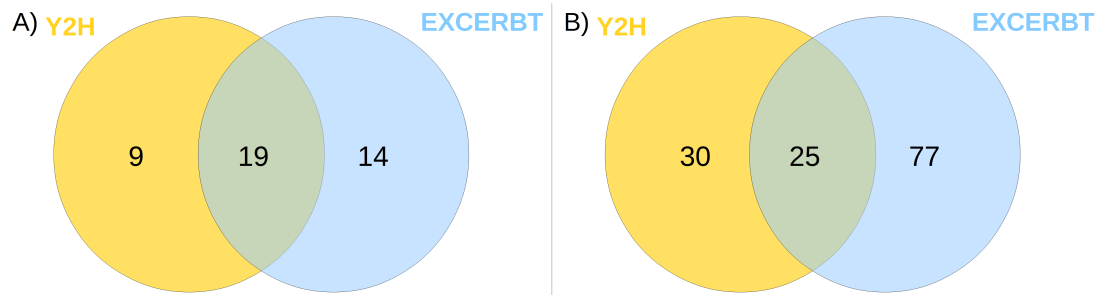


Abbildung 2.20: Übereinstimmung der Kategorien der Netzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom und EXCERBT sowie deren assoziierten miRNAs. - A) Summe der Übereinstimmung biologischer Prozesse auf Basis der in den Subnetzwerken vertretenen Kategorien. Einige Kategorien sind netzwerkspezifisch, während 19 in allen Subnetzwerken trotz deren unterschiedlicher Größe und Datengrundlage vertreten sind. B) Die miRNAs der einzelnen Netzwerke basierend auf Y2H-Daten sowie EXCERBT wurden auf Überlappungen untersucht. 25 miRNAs stimmen bei allen Subnetzwerken überein.

2. ERGEBNISSE

Kapitel 3

Diskussion

Die globale, bioinformatische Analyse fokussierte auf die Meta-Ebene retrograder Signale und hatte die Einordnung der mit diesen Signalen verknüpften Pfaden und Auslösern sowie die Charakterisierung angeschlossener Module zum Ziel. Sie stützte sich auf Transkriptomdaten, die plastidäre Signale unter verschiedenen Aspekten betrachteten und einen Vergleich zwischen Pflanzen mit gestörter und Pflanzen mit intakter retrograder Signalgebung zuließen. Anhand der veränderten Transkription bestimmter Gene gegenüber der Referenz konnten spezifische Module identifiziert und mithilfe von Literaturangaben, GO-Anreicherungsanalysen sowie Betrachtungen der gemeinsamen *cis*-Elemente charakterisiert werden. Die Einbettung der Gene, die diese Module ausbildeten, in metabolische Pfade sowie die Einbettung der Proteinprodukte dieser Gene in Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken erweiterte die Beschreibung der Module auf systembiologischer Ebene, sodass die bioinformatische Analyse über integrative und vergleichende Analysen retrograde Signale in das allgemeine, zelluläre Netzwerk einordnen konnte. Im Folgenden werden die *in silico* Ergebnisse der globalen Analyse diskutiert.

3.1 Retrograde Signale sind eng an Zucker-, ABA-, Auxin-, ROS- und Calcium-Signale angeschlossen

Die Charakterisierung des Kernantwortmoduls anhand der Literatur zeigte, dass ein Großteil der Gene durch die vier Signale ABA, Zucker, ROS und Auxin induziert werden (vgl. 2.3.2). Die nachfolgenden Analysen wie Netzwerkanalysen, *cis*-, GO- und Pfadanalysen bezogen auf laterale Module ließen ebenso teilweise auf diese Signale schließen. Zwar kann man auf Grund von Experiment 4, welches Zucker-Signale anhand gestörter Stärkesynthese und gestörtem Triosephosphattransport betrachtet, davon ausgehen, dass Zucker-Signale in den Daten identifiziert werden, jedoch sind anhand des Grundmoduls Zucker-Signale in allen sechs Experimenten identifiziert worden. Sie spielen daher mutmaßlich eine grundsätzliche Rolle bei der Ausprägung retrograder Signale. Ebenso ist die ABA-Synthese an den Tetrapyrrolpfad gekoppelt (vgl. 1.4), der durch zwei der hier verwendeten Experimente beeinflusst wird. Jedoch sind auch ABA-Signale anhand des Grundmoduls in allen sechs Experimenten identifiziert worden, sodass auf deren grundlegende Rolle bei retrograden Signalen geschlossen werden kann.

Im Gegensatz zu ABA, Zucker und ROS wurde Auxin bisher nicht im Zusammenhang mit retrograden Signalen beschrieben. Auch zeigten einige Gene Abhängigkeit von Calcium. Calcium wurde bisher ebenfalls nicht im Zusammenhang mit retrograden Signalen beschrieben, jedoch wurde dessen Beteiligung an retrograden Signalen über sogenannte *Calcium waves* postuliert [Pfannschmidt, 2010]. Auch agiert Calcium in vielen Signalpfaden als Sekundärbote [Echevarría et al., 2003] und reguliert unter anderem die Öffnung der Stomata [Dodd et al., 2010] im Zusammenspiel mit ABA [Nomura et al., 2008]. Beachtet man, dass Calcium nicht ausschließlich in Chloroplasten vorhanden ist, so könnte die beobachtete Calcium-Abhängigkeit auf einen sekundär angeschlossen Pfad der retrograden Signalkette hindeuten (vgl. 3.8) und eine Verbindung zu ABA-Signalen besitzen. Auch Auxin ist an der Regulation der stomatären Öffnung in Zusammenarbeit mit Gibberellin beteiligt [Saibo et al., 2003] und tritt hier als Antagonist zu ABA auf. Vorstufen des Auxins werden über den Shikimatpfad im Chloroplasten gebildet [Mano und Nemoto, 2012], weshalb Auxin-Signale über chloroplastidäre Signale, die sich direkt auf dessen Synthesestufen auswirken, beeinflusst werden können. Auxin ist somit ein mögliches sekundäres Signal, angeschlossen an das eigentliche retrograde Signal. Auch wurde postuliert, dass Auxin-induzierte Gene durch

3.1 Retrograde Signale sind eng an Zucker-, ABA-, Auxin-, ROS- und Calcium-Signale angeschlossen

ROS aktiviert werden können [Pasternak et al., 2005; Mittler, 2002; Hirt, 2000]. In diesem Fall wären ROS-Signale die primären Signale, da man auf Transkriptomebene zwar auf Auxin als Signal schließen könnte, die Gene aber durch ROS-Signale induziert würden.

ABA hingegen wurde als mit retrograden Signalen verknüpft beschrieben. Wie in 1.2.5 dargestellt, werden Vorläufer von ABA ebenso wie Auxin-Synthesestufen im Chloroplasten synthetisiert, sodass eine indirekte Verbindung zu chloroplastidären Signalen gegeben ist. Ebenso wie bei Auxin ist es möglich, dass die ABA-Synthese im Chloroplasten durch die primären, retrograden Signale beeinflusst wird und zu einem ABA-Signal führt. Jedoch wird ABA auch in verschiedenen Studien, die Stress wie Wassermangel [Jia et al., 2002] an *A. thaliana* untersuchen, als Signal beschrieben. Daher ist auch ABA möglicherweise eine sekundäre Antwort auf ein retrogrades Signal.

Zucker wird direkt im Chloroplasten synthetisiert. Zucker- und ABA-Signale zeigen eine enge Kooperation [Smeekens, 2000; Çakir et al., 2003; Cho et al., 2010; Hey et al., 2010] und werden bei etlichen Genen in die selbe Promoterregion integriert [Rook et al., 2006]. Es ist daher möglich, dass die Synthese von ABA-Intermediaten durch alternierende Zuckerspiegel oder spezifische Verhältnisse verschiedener Zuckerarten beeinflusst wird. Ebenso ist es möglich, dass einige Gene des Grundmoduls sowohl durch ABA als auch durch Zucker induziert werden. Dies ist auch bei den Ergebnissen der Literaturrecherche zu den einzelnen Genen zu beobachten (vgl. Abb. 2.7).

Ebenso wie Zucker treten auch ROS direkt im Chloroplasten auf (vgl. 1.2.2). Die Verknüpfung zwischen ROS und ABA als mögliches sekundäres Signal zeigt sich in der Abhängigkeit der ABA-Synthese von Ascorbat, einem potenziellen Anti-Oxidans [Baier und Dietz, 2005]. Eine weitere Studie zeigte, dass ROS-Signale mit ABA-Signalen interferieren [Baier et al., 2004]. Bei nachfolgenden Analysen tritt jedoch ROS als expliziter Terminus nicht mehr in Erscheinung (vgl. 2.3.6 ff., 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.4 ff.), sondern Redox-Signale. Diese beiden unterschiedlichen Signale wurden auch in der Literatur oft als miteinander verknüpft dargestellt, sodass hier vermutlich eher ein Redox- als ein ROS-Signal vorliegt. Die Beteiligung eines ROS-Signals an der Modulation der Grundmodulgene ist somit unklar.

Die hierarchische Einteilung in 2.3.4 zeigte, dass das Zucker-Experiment von Dr. Iris Finkemeier nach Norflurazon die größte Übereinstimmung mit den hier beobachteten Genen im Kernantwortmodul aufweist. Die Gene sind somit mutmaßlich größtenteils

3. DISKUSSION

durch Zucker induziert, gefolgt von ABA, Auxin und ROS. Bei letzterem wurde anhand der *flu*-Mutante, die bei Belichtung Singulett-Sauerstoff 1O_2 generiert [Lee et al., 2007], auf Singulett-Sauerstoff getestet. Da die Schnittmenge zwischen den Genen des Grundmoduls und denen der *flu*-Mutante im Vergleich zu Zucker nicht sehr stark ausgeprägt war, ist eventuell zusätzlich eine andere ROS-Spezies an der Induktion der Gene im Grundmodul beteiligt.

Die Ergebnisse der integrativen Analyse der sechs Experimente (vgl. 2.1) lassen verschiedene Vermutungen im Bezug auf die Natur des retrograden Signals zu. So kann postuliert werden, dass plastidäre Signale entweder durch ein Zusammenwirken von Zucker, ABA und Auxin moduliert werden oder diese als Sekundärsignale dem retrograden Signal angeschlossen sind. Zucker-, ROS- oder auch Redox-Signale können hierbei, betrachtet man deren Syntheseort, direkt an retrograde Signale gekoppelt sein. Es ist jedoch zu beachten, dass eine Transkriptomanalyse lediglich eine indirekte Identifikation zu Grunde liegender Signale erlaubt (vgl. 1.3). Auch ist auffällig, dass lediglich eine geringe Anzahl der Gene des Grundmoduls für chloroplastidär lokalisierte Proteine kodiert und keines der Gene im chloroplastidären Genom anzutreffen ist. Die Signale Zucker, ROS, ABA, Auxin und auch Calcium induzieren daher mutmaßlich direkt nukleäre Genexpression und können potenziell retrograde Signale übermitteln. Des Weiteren ist anzunehmen, dass es sich bei den Genen des Grundmoduls nicht um die primären Zielgene des retrograden Signals handelt, sondern um sekundäre Zielgene, die retrograde Signale an die nukleäre Expression ankoppeln. Dafür spricht auch die Generalität der beobachteten Signale, da z.B. ABA auch in Stresssituationen wie Wassermangel als Signal in Aktion tritt. Als Kandidaten für primäre retrograde Signale stehen zur Zeit unter anderem die Metabolite 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat [Estavillo et al., 2011] oder β -Cyclocitral [Ramel et al., 2012] in der Diskussion [Leister, 2012]. Beide können nicht anhand einer Transkriptomanalyse beobachtet werden; eine zusätzliche Metabolomanalyse könnte jedoch die Verknüpfung der indirekt beobachteten Signale mit den hier vorgestellten Kandidaten beleuchten. Weiterhin muss kritisch betrachtet werden, dass in der Literatur möglicherweise nicht umfassend abgedeckt ist, welches Gen auf welchen Stimulus oder welches Signal reagiert. So könnte es sein, dass die hier identifizierten Gene auch auf andere Signale reagieren, welche jedoch bisher nicht analysiert, beobachtet und in der Literatur beschrieben wurden.

3.2 Retrograde Signale: Beeinflusst durch Licht und alternatives Spleißen?

3.2 Retrograde Signale: Beeinflusst durch Licht und alternatives Spleißen?

Allen Genen im Kernantwortmodul war laut FIRE ein Motiv, CGF1ATCAB2 (vgl. 2.3.3), gemein. Es beinhaltet eine lichtinduzierbare, konservierte I-Box und ist ein Motiv der LHCB-Gene (vgl. 2.3.3), die in Studien zur retrograden Signalgebung als Markergene verwendet wurden [Gray et al., 1995; Nott et al., 2006; Pesaresi et al., 2007]. Daher werden retrograde Signale als eng mit Licht-Signalen verbunden angesehen [Pfannschmidt, 2010; Ruckle et al., 2007]. Der Vergleich von Arrays, die Hochlicht untersuchten, mit den Grundmodulgenen zeigte jedoch keine Übereinstimmung der differenziell regulierten Gene mit den Genen des Grundmoduls (s. 2.3.4). Da eines der verwendeten Experimente, Experiment 4, auch mit verschiedenen Lichtqualitäten retrograde Signale auslöste und eine Teilmenge dessen differenziell exprimierten Gene im Grundmodul vertreten waren, ist die nicht vorhandene Schnittmenge zwischen dem Hochlichtexperiment und dem Grundmodul sehr erstaunlich. Möglicherweise spielt die Lichtqualität bzw. -intensität eine bedeutende Rolle oder auch die Wachstumsbedingungen für *A. thaliana*. Experiment 4 verwendete intakte Pflanzen, das Hochlichtexperiment von González-Pérez et al., 2011, *A. thaliana*-Zellkulturen. Die Lichtintensität bei Experiment 4 betrug unter Hochlichtbedingungen $800 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$, beim Experiment von González-Pérez et al., 2011, $1800 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die Experimente sind daher nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Eine weitere Hypothese ist, dass das hier gefundene Motiv eine Rolle in Signalpfaden spielt, die unabhängig von Licht sind. Auch ist die von FIRE optimierte Sequenz des Motivs einer TATA-Box sehr ähnlich.

Die Betrachtung der Gene im Bezug auf alternatives Spleißen führte, je nach Datenlage, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Laut ASIP [Wang und Brendel, 2006] zeigten alle Gene des Kernantwortmoduls alternative Spleißvarianten. Alternatives Spleißen wird durch verschiedene Stimuli beeinflusst und moduliert dadurch abhängig von bestimmten Stimuli die Varianz des Proteinensatzes einer Zelle [Barbazuk et al., 2008] ebenso wie die Struktur der Proteine, sodass diese mit verschiedenen Partnern interagieren können [Syed et al., 2012]. Diese alternativen Spleißvarianten wären auf einem Microarray nicht detektierbar, könnten allerdings zu einer Modulation der Genexpression auf Grund eines Signals, z.B. eines retrograden, führen. Betrachtet man jedoch

3. DISKUSSION

die aktuelleren, auf TAIR10 basierenden RNA-Seq-Daten (vgl. Tabelle 2.5), so zeigen die Gene kein auffälliges Spleißmuster. Dies könnte sowohl auf die geringere Sensitivität der in der ASIP Datenbank verwendeten ESTs gegenüber den RNA-Seq-Daten zurückzuführen sein, als auch auf die in der ASIP Datenbank verwendete ältere Annotation von *A. thaliana* (vgl. 2.3.5). Auch ist in einer genomweiten Studie zu alternativem Spleißen keines der Gene als Ziel einer so vermittelten Regulation aufgezeigt worden [Kalyna et al., 2011]. Auf Grund dieser neueren Daten erscheint es somit unwahrscheinlich, dass alternatives Spleißen bei der Regulation der Gene des Grundmoduls eine Rolle spielt oder retrograde Signale über alternatives Spleißen wirken. Des Weiteren liegen von den hier untersuchten Experimenten keine RNA-Seq-Daten vor, sodass alternative Spleißvarianten der Gene des Grundmoduls nicht weiter untersucht werden konnten.

3.3 Laterale Module weisen regulatorische Elemente, die mit ABA, Licht, Abwehrreaktion und Zucker in Verbindung stehen, auf

Neben 14 unbekanntem Motiven wurden einige Motive in den Promotoren der Gene, welche die lateralen Module bildeten, gefunden, die auf ABA-, Licht- und Zucker-Signale schließen lassen (vgl. 2.4.1). Die identifizierte W-Box im Promoter ist außerdem möglicherweise an der Modulation von Abwehrreaktionen beteiligt. Bei den gefundenen Motiven gilt es jedoch zu beachten, dass auch andere Signale, die noch nicht mit diesen Motiven in Zusammenhang gesetzt wurden, über diese ihre Wirkung ausüben könnten. Auch ist zu bedenken, dass die hier gefundenen Sequenzen zwar zu den jeweils identifizierten Motivklassen gehören, jedoch nicht zwangsweise durch die selben Transkriptionsfaktoren, die mit den beschriebenen Signalen in Verbindung stehen, gebunden werden müssen. Eine *cis*-Element-Analyse *in vitro* könnte hier Aufschluss geben und auch die unbekanntem Motive näher charakterisieren.

Die hier identifizierten Motive werden durch verschiedene Transkriptionsfaktorfamilien gebunden. Einige Vertreter dieser Familien sind in den lateralen Modulen differenziell exprimiert und binden potenziell an den regulatorischen Elementen (s. Tabelle A.15). Transkriptionsfaktoren der Familie MYB und MYC binden an ABREATRD22 sowie

3.4 GO-Anreicherungs- und Pfadanalysen charakterisieren dem Kernantwortmodul angeschlossene laterale Module

Transkriptionsfaktoren der Familie MYC an ATMYC2-RD22 [Abe et al., 1997]. ABRE-LIKE wird durch G-Box Transkriptionsfaktoren, die zur bZip-Familie gehören, erkannt [Giraudat et al., 1994]. ATHB6 hingegen wird von ABI1, einer Proteinphosphatase, gebunden [Himmelbach et al., 2002]. W-Boxen werden durch WRKY Transkriptionsfaktoren gebunden [Eulgem et al., 2000], während HEXAT eine Bindestelle für den zur Leucin-Zipper-Klasse gehörenden Transkriptionsfaktor TGA1, der nach seiner Kernbindesequenz TGACG benannt wurde [Després et al., 2003], ist. Die Regulation der Gene, welche die identifizierten *cis*-Elemente besitzen, kann somit potenziell über differenzielle Expression der sie bindenden Transkriptionsfaktoren stattfinden.

3.4 GO-Anreicherungs- und Pfadanalysen charakterisieren dem Kernantwortmodul angeschlossene laterale Module

Die GO-Anreicherungsanalyse der lateralen Module zeigte verschiedene Terme auf, die auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu Kategorien zusammengefasst wurden (vgl. 2.4.2). Am häufigsten trat die Kategorie *Transkription und Translation* auf. Dies deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der lateralen Module eine transkriptionelle und translationelle Reaktion auf ein spezifisches Signal zeigen. Dem nachfolgend sind, vernachlässigt man die Kategorien *Verschiedene* und *Kompartimente*, die Kategorien *Zucker* und *Hormone*. Zucker-Signale spielen eventuell eine Rolle bei der Ausprägung retrograder Signale (vgl. 3.1, Abb. 2.7), ebenso wie ABA, das in der Kategorie *Hormone* erfasst wurde. Die übrigen Kategorien, die nicht direkt auf ein Signal schließen lassen, könnten mit den Signalen, die anhand der Charakterisierung des Grundmoduls beobachtet wurden, in Verbindung stehen (vgl. 2.4.2). Die Kategorien *Wachstum und Entwicklung* und *Lipide, Zellwandetablierung* könnten daher auf die Wirkung des Wachstumshormons Auxin zurückzuführen sein. Auxin-Signale wurden jedoch nicht in angereicherten Termen abgebildet. Die Kategorie *Stress* hingegen kann in direktem Zusammenhang mit ABA stehen, welches sowohl bei den regulatorischen Elementen als auch bei den angereicherten GO-Termen identifiziert wurde. ROS-Signale hingegen wurden in der GO-Analyse nicht identifiziert.

3. DISKUSSION

Betrachtet man die Analysen der Module hinsichtlich der in ihnen vertretenen Pfade, so fällt auf, dass die Kategorien zwischen dieser und der GO-Anreicherungsanalyse weitestgehend übereinstimmen. Jedoch unterscheidet sich die Häufigkeit der jeweiligen Kategorien (vgl. Tabelle 2.8). Diese unterschiedliche Ausprägung könnte auf die unterschiedlichen, zu Grunde liegenden Datenbanken und Algorithmen zurückzuführen sein. Zusammenfassend ließe sich anhand der Analysen der lateralen Module postulieren, dass die Signale ABA, Zucker, Licht und Auxin zur Aktivierung lateraler Wachstums-, Stress-, und Transkriptionsmodule führen könnten. Jedoch sollte beachtet werden, dass die angereicherten Terme ihrer Ähnlichkeit wegen in Kategorien eingeteilt wurden. Diese Vorgehensweise könnte eine zu starke Verallgemeinerung darstellen. Bezüglich der Pfadanalyse muss beachtet werden, dass der zu Grunde liegende statistische Test, eine Monte-Carlo-Simulation, nur auf dem Gesamtgenom von *A. thaliana* basieren konnte. So wird die Verzerrung des zu testenden Genraums, die durch die zwangsläufige Reduktion des Genraumes auf die Gene, die auf den Affymetrix™ ATH1 Chips vorhanden sind, entsteht, nicht beachtet und könnte auch die Unterschiede zur GO-Analyse erklären.

3.5 Retrograde Signale sind in ein komplexes zelluläres Netzwerk eingebettet

Trotz unterschiedlicher Datengrundlage der PPI-Netzwerke, die auf den Genen des Grundmoduls sowie ihren direkten oder indirekten Interaktionspartnern aufbauten (vgl. 2.3.6 ff.), wiesen sie ähnliche Module auf (vgl. Tabelle A.12). So waren allen Netzwerken Module der Transkription, Translation, Abwehr, Phosphorylierung, der Auxin Signalgebung, des Transports und Wachstums gemein. Auch Stressmodule sowie Module der Proteinmodifikation und Abwehr wurden bei allen Netzwerken identifiziert. Module, welche zum Chloroplast gehören oder chloroplastidäre Prozesse aufzeigen, wurden ebenfalls bei allen Netzwerken identifiziert. Bei den Netzwerken, die auf den Genen der lateralen Module und ihren direkten Interaktionspartnern aufbauten, wurden ähnliche Module gefunden (vgl. Tabelle A.19). Die gemeinsamen Module der Netzwerke überwogen solche, die nur bei bestimmten Netzwerken auftraten. Beispielsweise waren Zucker-Module bei allen Netzwerken bis auf das basierend auf Y2H-Daten vorhanden

3.5 Retrograde Signale sind in ein komplexes zelluläres Netzwerk eingebettet

(vgl. 2.3.6.1).

Betrachtet man die Lage der Grundmodulgene in den Netzwerken basierend auf diesen Genen sowie ihren direkten und indirekten Interaktionspartnern, so fällt auf, dass sie teilweise als Hubs in Erscheinung treten. Dies war bei den Netzwerken basierend auf ANAP und AraNet (vgl. 2.3.6.3, 2.3.6.2) zu erwarten, da hier nur direkte Interaktionspartner betrachtet wurden. Dennoch zeigen sich auch bei dem Y2H-Netzwerk zwei Grundmodulgene, LSU2 und IAA2, als Hubs. Ebenso zeigt sich eines der Grundmodulgene, STP1, als stärkster Hub des AraNet Netzwerkes mit 644 Interaktionspartnern (vgl. 2.3.6.3, Abb. 2.12). Diese Eigenschaft der Grundmodulgene zeigt sich jedoch nicht in den Netzwerken, die auf den Proteinprodukten der Gene in den lateralen Modulen basieren (vgl. Abb. 2.18 und 2.19). Der Grund hierfür könnten strukturelle Unterschiede der Netzwerke sein. Die Grundmodulgene sind nicht im Zentrum der Netzwerke basierend auf den lateralen Modulen, sondern liegen teilweise am Rand und zeigen daher die Hub-Strukturen nicht.

Eine weitere Auffälligkeit der Netzwerke ist, dass nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus' kaum Verknüpfungsgruppen mit einer Dichte über Null anzutreffen sind. Die Dichte ist ein Maß für die Trennungsschärfe der Gruppen und beschreibt die Verknüpfungsstruktur der Knoten des Netzwerkes. Besitzt beispielsweise ein Knoten jeweils eine Verbindung zu einem anderen, der wiederum in eine ähnliche Struktur eingebettet ist, so wäre die Zuordnung dieses Knotens zu beiden Gruppierungen ähnlich. Die daraus resultierende Dichte beider Verknüpfungsgruppen wäre Null, da man den Knoten sowohl zur einen als auch zur anderen Gruppe gruppieren könnte. Die Struktur der Verknüpfungen könnte folglich der Grund sein, warum die Netzwerke kaum Gruppen mit einer Dichte über Null aufweisen. Diese Eigenschaft ist allen Netzwerken gemein und könnte die immer wieder beobachtete Interferenz der Kategorien einzelner Module widerspiegeln. Die Module sind nicht klar voneinander getrennt und weisen Redundanzen auf, die zur Stabilität des Gesamtsignalnetzwerkes beitragen könnten. Die Interferenzen sind bei einigen Netzwerken deutlich stärker ausgeprägt als bei anderen. Die sehr unterschiedliche Größe an Gesamtinteraktionen der verschiedenen Interaktome sowie die unterschiedliche Anzahl an Interaktoren könnte hierfür der Grund sein.

Die postulierten Signale ABA, Auxin und Zucker konnten teilweise auch in den Modulen der Netzwerke identifiziert werden, nicht jedoch ROS-Signale. Sie könnten mit Modulen, die Glutaredoxine als Antioxidantien oder Redox Homöostase beinhalten, in

3. DISKUSSION

Verbindung stehen. Womöglich sind sie durch Module, die Licht als potenzielle Signale zeigen, reflektiert. Auch zeigt sich, dass die Grundmodulgene als Hubs in verschiedene zelluläre Netzwerke integriert sind und eventuell als Hauptregulatoren der nukleären Antwort auf retrograde Signale agieren. Sie formen nicht ein in sich abgeschlossenes Modul, sondern werden in das allgemeine, zelluläre Signal- und metabolische Netzwerk integriert. Weiterhin zeigen die Module, in welche die retrograden Signale integriert werden, leichte bis starke Interferenzen, was auf gegenseitige Modulation und Redundanzen schließen lässt.

Durch die starke Einbettung des Grundmoduls in das allgemeine, zelluläre Signal- und metabolische Netzwerk, kann es als Kopplungsstelle zwischen plastidären und cytosolischen Netzwerken interpretiert werden. Demnach wären die Gene, die das Grundmodul ausbilden, zentrale Schnittstellen, die chloroplastidäre Funktionen an cytosolische und nukleäre Funktionen koppeln. Solche Schnittstellen gewährleisten die Integration des Organells in die Pflanzenzelle und sind daher von zentraler Bedeutung. Die große Schnittmenge der Gene des Grundmoduls mit Genen, die bei einer Norflurazon-behandelten Wildtyppflanze differenziell exprimiert sind (vgl. 2.3.4, Tabelle 2.4), ist ein weiteres Indiz für die zentrale Bedeutung der Gene des Grundmoduls als Kopplungsstelle zwischen plastidären und cytosolischen Netzwerken. Norflurazon zerstört, wie eingangs beschrieben (vgl. 1.4), den Chloroplasten durch Oxidation. Der Chloroplast wird daher nicht mehr in die Pflanzenzelle integriert und die Kopplungsstellen, die Gene des Grundmoduls, zeigen als Reaktion fast alle eine differenzielle Expression im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp.

3.6 Retrograde Signale bestehen aus verschiedenen Signalen

Bei den systembiologischen Auswertungen basierend auf dem Grundmodul sowie den lateralen Modulen traten stets mehrere Signale auf. Diese Signale waren, wie beschrieben, ABA, Auxin sowie Zucker und ROS oder Redox-Signale. Die Auswertungen der verschiedenen Netzwerke zeigten des Weiteren die starke Integration sowohl des Grundmoduls als auch der lateralen Module in das allgemeine, cytosolische Netzwerk. Beide

3.7 Werden retrograde Signalkaskaden durch miRNAs reguliert?

Beobachtungen lassen darauf schließen, dass retrograde Signale nicht distinkte, voneinander unabhängige Signale sind, sondern verschiedene Signale die retrograde Signalkette ausbilden und mit dem allgemeinen cytosolischen Netzwerk interagieren. Wie in 3.1 beschrieben, könnten sie sich gegenseitig stark beeinflussen und in einer bestimmten Hierarchie stehen. Wie aus den Netzwerkanalysen folgte, werden diese Signale nicht in spezifische retrograde Module integriert, sondern direkt in das zelluläre Signalnetzwerk eingebunden. Betrachtet man die eingangs formulierten Hypothesen (vgl. 1.4.3), so beschreibt die Hypothese nach Pfannschmidt, 2010, am ehesten diese Beobachtungen. Demnach sind verschiedene retrograde Signale gekoppelt und direkt in das cytosolische Netzwerk integriert (vgl. Abb. 1.8A). Sie zeigen somit starke Interferenzen und kein in sich abgeschlossenes, retrogrades Signalmodul.

3.7 Werden retrograde Signalkaskaden durch miRNAs reguliert?

Bei der Untersuchung der Netzwerke zeigten sich in jedem Netzwerk miRNAs, die Gene der Proteine der gefilterten Verknüpfungsgruppen als Ziel haben (vgl. Tabellen A.6, A.8, A.10, A.17 und A.18). Vier der Grundmodulgene sind als Ziel von miRNAs bekannt, was deutlich über den statistischen Erwartungen liegt (vgl. 2.3.6, Tabelle 2.6). Auffällig ist bei allen Netzwerken, dass es sequenzähnliche miRNA-Familien sind, die eine regulatorische Wirkung auf die jeweiligen Netzwerke haben können und dass bei einigen Netzwerken miRNAs Module verknüpfen, wie es beispielsweise bei dem Netzwerk basierend auf ANAP der Fall war (vgl. Abb. 2.11). Die jeweiligen Zielgene der miRNAs sind fast ausschließlich Transkriptionsfaktoren (vgl. Tabelle 2.7, Tabelle A.20). Eine Regulation der Transkription, eventuell als Reaktion auf retrograde Signale, könnte somit über miRNAs stattfinden. Jedoch können die verwendeten, Array-basierten Transkriptomdaten keinen Aufschluss darüber liefern, ob und in welchem Ausmaß miRNAs an der Regulierung retrograder Signale beteiligt sind. Deren Beteiligung an der Ausprägung der retrograden Signalkaskade ist zwar durch die *in silico* aufgebauten Netzwerke wahrscheinlich, bedarf aber weiterer experimenteller Überprüfung.

3.8 Immunantworten hängen eng mit retrograden Signalen zusammen

Sowohl bei der FIRE-Analyse der lateralen Module (vgl. 2.4.1) als auch bei den anschließenden GO-Anreicherungs- (vgl. 2.8) und Pfadanalysen (vgl. 2.4.3) zeigten sich Motive und Terme, die auf eine Abwehrreaktion hindeuten. Auch die Netzwerkanalysen zeigten Module, die zu einer Abwehrreaktion gehören. Erst kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, die sich mit dem Zusammenhang retrograder Signale und Immunantworten in der Pflanze befasste [Nomura et al., 2012]. In dieser Studie wurde ein Zusammenhang zwischen Pathogen-assoziierten Signalen und der Übertragung dieser auf Calcium-Signale im Chloroplasten untersucht. Dabei wurde ein Protein, CALCIUM-SENSING RECEPTOR (CAS) hervorgehoben, welches zur Regulation chloroplastidärer Genexpression beiträgt. Auch ist es an der Regulation der Salicylsäuresynthese beteiligt. Weiterhin zeigte die Studie eine W-Box auf, die in diesem Pfad eine regulatorische Rolle einnehmen könnte und in der FIRE-Analyse der lateralen Module identifiziert wurde. Einige damit in Verbindung gebrachten WRKY-Transkriptionsfaktoren, WRKY33 und WRKY46, sind auch in den lateralen Modulen vorhanden. Ebenso sind Transkriptionsfaktoren, die laut Nomura et al., 2012, für die Entwicklung des Chloroplasten essentiell sind, in den lateralen Modulen differenziell exprimiert (AtGLK2, CIA2, GATA21 (GNC), AtSIG4). Eines der Gene, das laut dieser Studie als an der Abwehrreaktion beteiligt betrachtet wird, ist EDS5. Dieses ist eines der Grundmodulgene und den Autoren zufolge ein Markergen für das Signal Singulett-Sauerstoff.

Die Ergebnisse der Studie von Nomura et al., 2012, zeigen Kongruenz mit den *in silico* Ergebnissen. Betrachtet man die Übereinstimmung zwischen den Daten der lateralen Module sowie des Kernantwortmoduls mit der hier dargestellten Studie, so scheint ein Großteil des in der Studie postulierten Pfades der Abwehrreaktion auch durch retrograde Signale angesprochen zu werden. So wurde im Kernantwortmodul Calcium, möglicherweise sogar als Signal, beobachtet. Es ist daher wahrscheinlich, dass die in der Transkriptomanalyse beobachteten Calcium-Signale Module der Abwehrreaktionen beeinflussen. Auch besteht laut der Studie ein Zusammenhang zwischen ROS-Signalen auf der einen und CAS-aktivierter Abwehrreaktion auf der anderen Seite, sodass hier ein Zusammenhang zwischen ROS als dem retrogradem Signal eng angeschlossene Signale und Abwehrreaktionen bestehen kann. Jedoch gehen die Autoren nicht auf den

3.9 Neuere Studien zeigen die Beteiligung von Proteolysevorgängen an retrograden Signalen

Zusammenhang zwischen chloroplastidären ROS-Signalen und Calcium ein, sodass nur spekuliert werden kann, ob ROS-Signale die beobachteten Calcium-Signale beeinflussen.

3.9 Neuere Studien zeigen die Beteiligung von Proteolysevorgängen an retrograden Signalen

In einer Studie von Sun et al., 2011, wurde die Beteiligung des an der chloroplastidären Lamina gebundenen Transkriptionsfaktors PLANT HOMEODOMAIN TYPE TRANSCRIPTION FACTOR WITH TRANSMEMBRANE DOMAINS (PTM) an der Übertragung chloroplastidärer Signale zum Nukleus beschrieben. Dieser wird durch proteolytische Spaltung aktiviert. Im Netzwerk basierend auf AraNet und den Grundmodulgenen wurden Module der Proteolyse identifiziert (vgl. Tabelle A.11). Auch zeigte sich PTM als Bestandteil der Gene, welche die lateralen Module ausbilden. Die biochemisch-physiologische Charakterisierung von PTM ist daher in Übereinstimmung mit Untersuchungen und Ergebnissen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden und unterstreicht die Signifikanz und Sensitivität der erzielten Ergebnisse. Auf Grund der *in silico* Ergebnisse lässt sich eine Rolle von proteolytischen Vorgängen auch in der retrograden Signaltransduktion postulieren. Diese geht möglicherweise über PTM hinaus und umfasst noch weitere Gene dieser Funktionalität.

3. DISKUSSION

Kapitel 4

Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Experimente verwendet, die retrograde Signale anhand eines intakten Chloroplasten (sogenannte *operational control* [Pogson et al., 2008]) betrachten. Diese zeigten eine signifikant große Schnittmenge ($p = 2,57 \times 10^{-5}$) von 39 Genen der jeweils differenziell regulierten Gene in den Experimenten, sodass diese als Kernantwortmodul auf retrograde Signale oder als Grundmodul eingestuft wurden. Laterale Module (vgl. 2.4) wurden anhand von regulatorischen Elementen, GO-Anreicherungsanalysen sowie deren Einbettung in metabolische Pfade und PPI-Netzwerke beschrieben. Die Ergebnisse der Untersuchungen sowohl des Grundmoduls als auch der lateralen Modulen weisen auf mögliche ABA-, Zucker-, Auxin- und Calcium-Signale hin. Das Grundmodul selbst reflektierte laut Literatur zusätzlich das Signal ROS, welches jedoch in der Einbettung des Grundmoduls in PPI-Netzwerke sowie den lateralen Modulen nicht mehr aufgezeigt wurde. Stressantworten und Module, die Wachstumsvorgänge sowie Immunantworten beschreiben, wurden ebenso in den separaten Analysen konstant identifiziert. Der Zusammenhang zwischen diesen Modulen und den Signalen ABA, Auxin, Zucker, Calcium und potenziell auch ROS wird im Folgenden in einer Hypothese zusammengefasst.

Die Module, die mit dem Grundmodul in Verbindung stehen, können mit den gezeigten Signalen in Relation gesetzt werden. So sind Module, die Stressantworten reflektieren, durch ABA an die retrograde Signalkette gekoppelt. Module des Wachstums sowie der Entwicklungsregulation können dementsprechend mit Auxin in Verbindung stehen, während Immunantworten mit Calcium-Signalen verknüpft sind (vgl. 3.8).

4. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Wie in 3.1 dargestellt, sind Zucker-Signale oder Zucker-assoziierte Signale direkt den retrograden Signalen angeschlossen. ABA und Auxin, deren Synthese durch alternierende Zuckerspiegel im Chloroplasten beeinflusst werden können (vgl. Abb. 4.1 A), wären dem nachfolgende Signale und könnten als Sekundärantwort Stress- und Wachstumsmodule ansteuern. Calcium-Signale können ebenfalls mit Zucker-Signalen in Verbindung gesetzt werden. Wie eine Studie postuliert, wird beim Symport von Zucker und Protonen das Membranpotenzial depolarisiert [Furuichi et al., 2001]. Als Folge werden spannungsgesteuerte Calciumkanäle auf der Membran geöffnet und Calcium-Signale ausgelöst. Eventuell greift hier ein ähnlicher Mechanismus und koppelt Calcium-Signale mit den beobachteten Zucker-Signalen, die letztlich zu einer Modulation von Modulen führen, die mit Abwehrreaktionen assoziiert sind. Diese könnten jedoch auch eng mit Modulen der Stressantwort in Verbindung stehen. ROS-Signale stehen wahrscheinlich auch mit den beobachteten Calcium-Signalen in Verbindung (vgl. 3.8). Der Zusammenhang zwischen den Signalen ABA, Auxin und Calcium kann sich durch die Regulation der Öffnung der Stomata zeigen (vgl. 3.1, s. Abb. 4.1 B). Die Ergebnisse der Meta-Analyse lassen sich unter Berücksichtigung der hier postulierten Verknüpfungen und Hierarchien (vgl. 3) zu einem stark vereinfachten Modell der retrograden Signalkaskade verbinden (s. Abb. 4.1 C). Feedback-Loops, die z.B. über Beeinflussung durch Zuckerschwankungen bzw. -signale führen, sind in diesem Modell nicht berücksichtigt. Zucker-Signale wären in diesem Modell den primären retrograden Signalen direkt angeschlossen und führten über Modulation der ABA- und Auxinsynthese zu modifizierten ABA- und Auxin-Signalen. Calcium-Signale würden durch die Depolarisation der chloroplastidären Membran durch angehäuften oder reduzierten Protonen, bedingt durch Zucker-Symport in den Chloroplasten, ausgelöst und führten zur Modulation der Module, die mit Immunantworten assoziiert sind. ABA-Signale hingegen würden allgemeine, zelluläre Signalmodule beeinflussen, die mit Stress in Verbindung stehen. Möglicherweise ergeben sich hier Interferenzen zwischen Modulen der Stressantwort und der Immunantwort. Auxin-Signale wiederum beeinflussten das Wachstum und die Entwicklung. Auch beeinflussten sie, zusammen mit Calcium, die Schließung der Stomata.

Die Rolle der ROS-Signale im Bezug zu den anderen Signalen war bei den Analysen nicht eindeutig. Jedoch könnten sie an die Häufung von Protonen im Chloroplasten gekoppelt sein. Auch ist die Präsenz von ROS nur anhand der Literatur gegeben; sämtliche

nachfolgende Analysen zeigten Redox-Signale als mögliche Signale auf, sodass die Beteiligung von ROS an der Ausbildung der retrograden Signalkette nicht klar ist oder Redox-Signale in Betracht kommen. Ein Bypass von Zucker-Signalen, die keine nachgeschalteten Signale modulieren, erscheint durch die Ergebnisse der FIRE-Analyse der lateralen Module (vgl. 2.4.1) möglich.

Bei diesem Modell muss bedacht werden, dass es sich um ein stark vereinfachtes Modell handelt und die vielfach beobachteten Interferenzen zwischen den einzelnen Signalen und Modulen nicht berücksichtigt. Wie in 3.6 dargestellt, sind die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse am besten mit der Hypothese nach Pfannschmidt (s. Abb. 1.8 A) in Übereinstimmung zu bringen. Jedoch könnten sich die Signale gegenseitig stark beeinflussen und in einer bestimmten Hierarchie stehen. Pfannschmidt [Pfannschmidt, 2010] postulierte, dass das retrograde Signal in das allgemeine, zelluläre Signalnetzwerk integriert wird. Dieses wurde in den Netzwerkanalysen (vgl. 2.3.6, 2.4.4) gezeigt. Wie in 3.5 postuliert handelt es sich bei den Genen des Grundmoduls um Integratoren plastidärer Funktion in das cytosolische Signal- und Metabolismusnetzwerk. Womöglich besitzen diese eine zentrale Bedeutung bei der Integration des Organells Chloroplast in die Pflanzenzelle.

Die hier verwendete bioinformatische, integrative und vergleichende Analysestrategie zeigte sich als mächtiger Ansatz um nicht nur Datenmengen zu strukturieren und analysieren, sondern auch um in Assoziation mit experimenteller Analytik das vorgestellte systembiologische Modell des komplexen Vorgangs der retrograden Signalgebung zu entwerfen. Auch neue, potenzielle Ziele für experimentelle funktionale Charakterisierung konnten mit dieser Methodik aufgezeigt werden. Nachfolgende funktionelle Analysen dieser Komponenten bergen das große Potenzial, deren individuelle Rolle bei der Integration des Chloroplasten in das cytosolische Netzwerk zu charakterisieren.

4. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

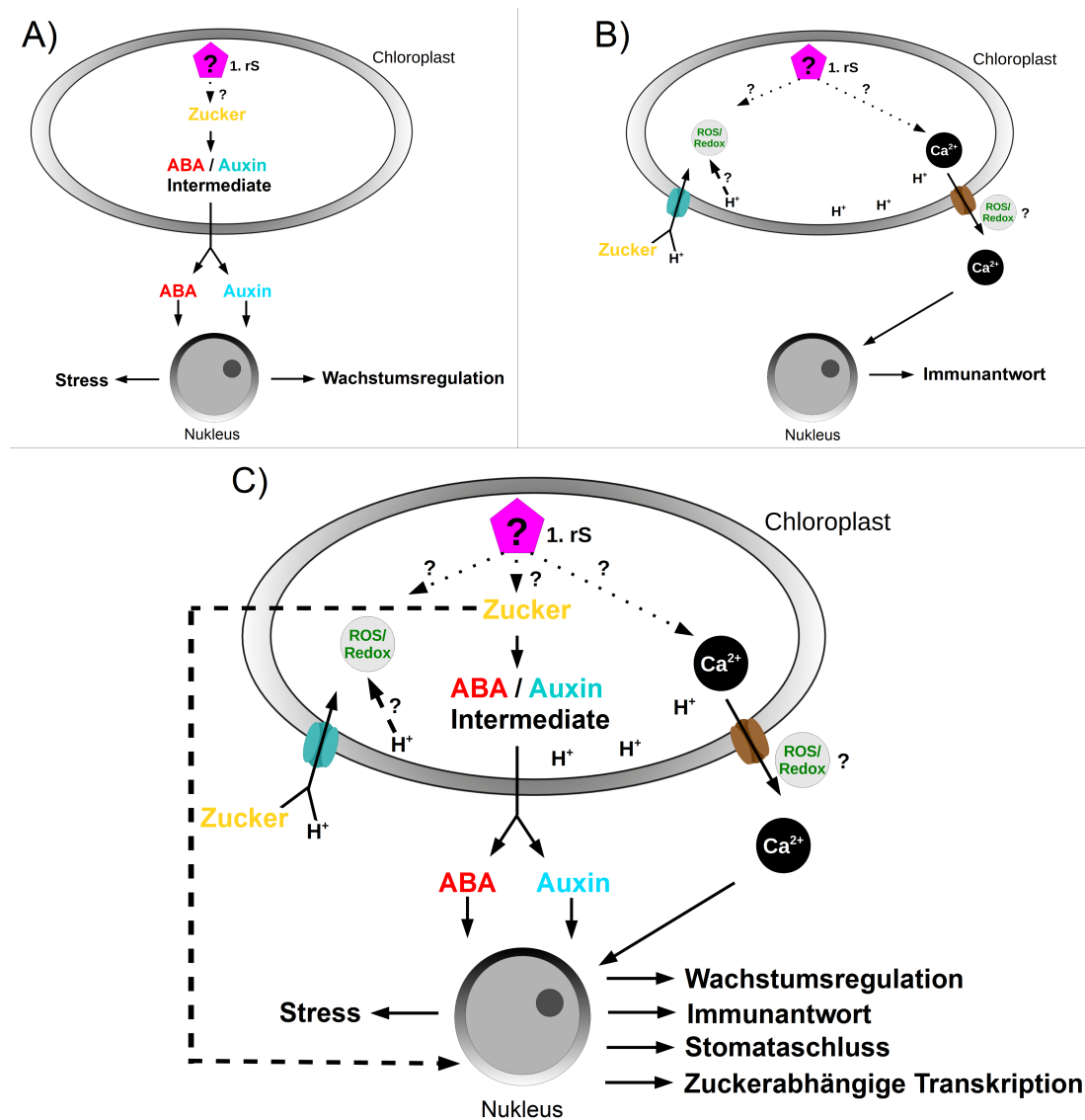


Abbildung 4.1: Darstellung der hypothesierten Zusammenwirkung verschiedener Signale in der retrograden Signalkette. - A) Einem möglichen primären retrograden Signal (1.rS) sind Zucker-Signale angeschlossen und werden in allgemeine ABA- und Auxin-Signale übersetzt, welche Module, die mit Stressreaktionen und Wachstumsregulation in Verbindung stehen, beeinflussen. B) Durch den verstärkten oder abgeschwächten Import von Zucker in den Chloroplasten wird die plastidäre Membran depolarisiert, was die Öffnung oder Schließung von spannungsgesteuerten Calciumkanälen zur Folge hat und dadurch *Calcium-Waves* entstehen lässt. Diese modulieren Immunantworten. C) Die Zusammenfassung von A) und B) sowie ein Bypass von Zucker-Signalen ist hier abgebildet, der unabhängig vom retrograden Signal agiert. Die Rolle von ROS/Redox-Signalen sowie die Natur des primären retrograden Signals sind jedoch unklar. Calcium-Signale interagieren mit ABA und Auxin bei der Stomaschließung. Auch ist die Komplexität, welche durch die Analysen gezeigt wurde, hier nicht abgebildet.

Kapitel 5

Material und Methoden

5.1 Biologische Experimente

5.1.1 Experiment 1: Tetrapyrrolpfad

Dieses Experiment wurde in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Grimm, Humboldt Universität Berlin, von Dr. Olaf Czarnecki durchgeführt.

A. thaliana (Ökotyp: Columbia) Samen wurden steril auf MS medium [Murashige und Skoog, 1962], das 0.8% (w:v) Agar und 10 μ M Gabaculin (5-Aminocyclohexa-1,3-diene-1-carboxyl-säure) enthielt, ausgebracht und für zwei Tage bei 4°C stratifiziert.

Nachdem sie für zwei Stunden Licht (80-100 μ mol quanta m⁻²s⁻¹) ausgesetzt wurden um die Germination zu synchronisieren, wurden sie für drei Tage bei 22-23°C dunkel inkubiert. Anschließend wurden die etiolierten Keimlinge belichtet (80-100 μ mol quanta m⁻²s⁻¹), geerntet und vor der RNA Extraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die anschließende Hybridisierung der RNA auf den Microarrays wurde die Gesamt-RNA mit dem Invisorb[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

Neben dem unbehandelten Wildtyp als Kontrolle wurde in einem Ansatz die 5-ALA-Synthese und dadurch folgend die Tetrapyrrol/Chlorophyllsynthese durch Zugabe von 10 μ M GAB gehemmt, sodass der Chlorophyllgehalt nach der Belichtung nur etwa 10% des Wildtypgehaltes ausmachte. In einem zweiten Ansatz wurde die *gun4-1* Mutante

5. MATERIAL UND METHODEN

[Susek et al., 1993; Larkin et al., 2003] verwendet, die auf Grund einer Mutation im GUN4-Protein ebenfalls eine verringerte ALA-Synthese aufweist. Von den drei genannten Ansätzen gibt es jeweils drei biologische Replikate.

5.1.2 Experiment 2: Magnesiumchelatase

Experiment 2 wurde in der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Grimm, Humboldt Universität Berlin, von Hagen Schlicke durchgeführt.

A. thaliana (Ökotyp: Columbia) Samen wurden auf einem Erde-Vermiculit-Gemisch (2:1 w:w; 2:1 w:w; Floragard Vertriebs GmbH für Gartenbau, Oldenburg) unter 10 Stunden Licht/14 Stunden Dunkelheit ($90 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) Zyklen in einer Wachstumskammer bei 22-23°C für drei Wochen nach Stratifikation wie in 5.1.1 beschrieben angezogen. Die Keimlinge wurden anschließend mit 20 μM Dexamethason (pOpOFF) bzw. 20 μM β -Estradiol (pMDC7) besprüht, jeweils 5 ml pro Keimling, und zu kontinuierlichem weißen Licht transferriert. Nach 6 Stunden wurden die oberirdischen Teile der Keimlinge geerntet, in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend mit dem InviTrap[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

Als Kontrolle diente auch hier der Wildtyp, der beiden Substanzen ausgesetzt wurde. In diesem Ansatz wurden zwei transgene Linien untersucht, die induziert eine Deregulation von zwei Enzymen der Chlorophyllsynthese aufweisen. Die CHLD pOpOff-Linie zeigt nach 6 Stunden einen reduzierten Transkriptgehalt des Gens der CHLD. Dies führt zeitversetzt zu einer Reduktion des Proteins und nach 3 Tagen zum Entgrünen der Blätter. Die Linie CHLM pMDC7 zeigt nach 6 Stunden einen gesteigerten Transkriptgehalt des Methyltransferase S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX (CHLM)-Gens. Von den vier Ansätzen liegen jeweils drei biologische Replikate vor.

5.1.3 Experiment 3: ROS schützendes Protein (RSP)/Änderung der Lichtqualität

Die biologischen Daten im Experiment 3 stammen von der Arbeitsgruppe Stoffwechselphysiologie und Biochemie der Pflanzen unter Leitung von Prof. Dr. Karl-Josef Dietz, Universität Bielefeld und wurden von Dr. Marc-Oliver Vogel angefertigt.

A. thaliana Samen, Ökotyp Columbia, wurden unter kontrollierten Bedingungen (Tag: 10 Stunden Licht mit $80 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei 21°C , Nacht: 18°C , 50% relative Luftfeuchtigkeit) auf einer 2:1:1 Bodenmischung Frühsdorfer Erde Klocke P nach 2 Tagen Stratifizierung angezogen. Nach drei Wochen wurden die Keimlinge entweder zu $8 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Schwachlicht, LL) oder zu $80 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (normales Licht, NL) für weitere 10 Tage überführt. 4,5 Wochen alte Pflanzen wurden zu Hochlicht ($800 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$, HL) eine Stunde nach Anschalten des Lichts transferriert. Kontrollpflanzen verblieben entweder bei Schwachlicht oder Normallicht. Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 Stunden wurden komplette Rosetten von 4-12 Pflanzen geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Hybridisierung auf den Microarrays wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy[®] Plant Mini Kit von Qiagen wie vom Hersteller beschrieben isoliert.

Neben dem Wildtyp dient in diesem Experiment eine Mutante der Untersuchung auf das retrograde Signal. Diese weist eine Mutation im RAP2.4 Transkriptionsfaktor auf, welche zu einer reduzierten Bindung des 2CPA Promoters führt. Dieser kodiert für ein Redox-aktives Protein, welches als Protektor gegen ROS-Stress bzw. oxidativen Stress dient. Von jedem Ansatz gibt es jeweils drei biologische Replikate.

5.1.4 Experiment 4: Stärkesynthese und Triosephosphattransport

Experiment 4 wurde von der Arbeitsgruppe Plant Cell and Developmental Biology unter der Leitung von Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge, Universität Köln, von Dr. Jessica Schmitz durchgeführt.

A. thaliana Samen, Ökotyp Columbia, wurden für 28 Tage auf einem Gemisch von Einheitserde (Gebr. Patzer GmbH, Sinntal-Jossa) und Vermiculit (3:1) ausgesät und für 48 h bei 4°C stratifiziert. Nach 10 Tagen wurden die Keimlinge auf diesem Substrat vereinzelt und in einer Phytokammer (Percival Scientific, Perry, Iowa) bei 40-60% relativer Luftfeuchte mit einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 16/8h und einer Temperatur von $22/20^\circ\text{C}$ im Schwachlicht (LL, $30 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$; kalt-weiß Neonröhren Lumilux, 18W/840 von Osram, München) angezogen. Nach 3,5 Stunden erfolgte die erste Probenahme. Die Pflanzen wurden anschließend für 4 Stunden dem Hochlicht ($300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ausgesetzt und diesen wieder Proben entnommen. Nach 2 Tagen Hochlicht im normalen Tagesrhythmus wurde die letzte Probe genommen. Alle

5. MATERIAL UND METHODEN

Proben wurden direkt nach der Ernte in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Logemann et al., 1987. 100 mg eingefrorenes Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 600 μl Puffer (8M Guanidium-HCL, 20 mM MES, 20 mM EDTA (pH 7,0), 0,7% (v:v) β -Mercaptoethanol) versetzt. Nach anschließender Zugabe von 500 μL Phenol/ Chloroform/ Isoamyl Alkohol (25:24:1) und gründlicher Durchmischung wurde der Extraktionsansatz zur Phasentrennung zentrifugiert (20000g, 10 min, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde entnommen und zur Ausfällung mit 0,05 Volumen 1M Essigsäure und 0,7 Volumen 100% Ethanol versetzt. Nach einer Stunde Ruhezeit auf Eis folgte eine erneute Zentrifugation (20000g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet wurde in 500 μl 3M Na-Acetat (pH 5,2) aufgenommen, mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde anschließend in 30 μl reinem H_2O aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die anschließende Qualitätskontrolle wurde mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt und die RNA erneut aufgereinigt [Schmitz, 2011].

Neben dem Wildtyp wurden drei Mutanten verwendet. Die Mutante *adg1-1* (Locus: AT5G48300) weist in der katalytischen Untereinheit der ADP-Glc Pyrophosphorylase einen Defekt auf und ist daher nicht in der Lage, Stärke zu synthetisieren. Die zweite Mutante, *tpt-2* (Locus: AT5G46110), zeigt eine Defizienz im Triosephosphat/Phosphat-Translokator der inneren Chloroplastenmembran. Die dritte Mutante ist eine Doppelmutante (DM) aus den beiden vorangegangenen und zeigt Wachstumsverzögerungen und einen verringerten Chlorophyllgehalt. Von jedem hier beschriebenen Ansatz sind jeweils zwei biologische Replikate vorhanden.

5.1.5 Experiment 5: Redox-Signale

Die Microarray-Daten von Experiment 5 stammen von der Arbeitsgruppe Pflanzliche Anpassung an Umweltveränderungen - Proteinanalyse mittels MS (FSU Jena), unter der Leitung von PD Dr. Thomas Pfannschmidt. Sie wurden von Dr. Lars Dietzel angefertigt.

A. thaliana Keimlinge wurden auf Topferde, welche 80:20 mit Vermiculit gemischt wurde, in temperaturkontrollierten Wachstumskammern bei $20-22^{\circ}\text{C}$ und einer Luft-

feuchtigkeit von 60% unter kontinuierlichem Licht angezogen. Die Dichte der Keimlinge wurde so bestimmt, dass 23 Tage alte Pflanzen sich nicht überschatteten. Nach zwei Tagen bei 4°C wurden die Pflanzen für 20 Tage in weißem Licht, gespendet von einer 18W Fluoreszenzlampe *Universal white* (Osram, München) mit einer photosynthetisch aktiven Leuchtkraft (PAL, 400-700 nm) von ca. 35 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$, vorkultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen für drei Tage entweder an PSI- oder PSII-Licht (18W Fluoreszenzlampe *red*, Osram, bedeckt mit einem Rotlichtfilter 027, mittelrot, Lee Filters, Andover, UK, PAL ca. 20 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 18W Fluoreszenzlampe *cool-white*, Osram, bedeckt mit einem Gelblichtfilter 105, orange, Lee Filters, Andover, UK, PAL ca. 30 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) akklimatisiert und dann jeweils für 30 oder 60 Minuten von PSI- auf PSII-Licht umgestellt, sodass Redox-Signale aktiviert wurden. Danach wurde das Pflanzenmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Gesamt-RNA Isolation erfolgte wie in Logemann et al., 1987, beschrieben. 250 mg gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in einem Mörser homogenisiert und in Extraktionspuffer (8M Guanidinium-HCl, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 50 mM Beta-mercaptoethanol, pH 7.0) resuspendiert, anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) extrahiert und mit 0,05 Volumen Essigsäure (1M) und 0,7 Volumen Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde zweimal mit 3M Na-Acetat (pH 5,2) und einmal mit 70% Ethanol gewaschen und in RNase-freiem Wasser gelöst (Qiagen). Zusätzlich wurde die RNA mit dem Qiagen RNeasy[®] purification kit gereinigt.

Neben dem Wildtyp (Ökotyp Columbia) wurde die Mutante *stn7* (SALK_073254) eingeführt, die eine Mutation in der Thylakoid Protein Kinase STN7 (Locus: AT1G68830) aufweist. Dieses Protein vermittelt die Anpassung der photosynthetischen Maschinerie an Änderungen der Wellenlänge des eintreffenden Lichtes. Da dieses Protein in der Mutante nicht mehr funktionsfähig ist, ist diese nicht mehr in der Lage auf sich ändernde Lichtverhältnisse zu reagieren. Auch in diesem Experiment sind pro Ansatz drei biologische Replikate vorhanden.

5.1.6 Experiment 6: Anpassung der Photosynthese

Die Gruppe Molekularbiologie der Pflanzen/Botanik der LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. Dario Leister trägt mit Experiment 6 zur Meta-Analyse bei.

5. MATERIAL UND METHODEN

A.thaliana Samen wurden in Plastikschaalen mit Blumenerde (Stender) für 3 Tage bei 2-5°C inkubiert, um die Keimruhe zu brechen. Anschließend wurden die Pflanzen in einer Wachstumskammer für vier Wochen bei einem Tag/Nacht-Rhythmus (Tageslicht: HQI Powerstar 400W/D, ca. 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) von 10 zu 14 Stunden angezogen. Auch wurde Wuxal Super fertilizer (8% N, 8% P₂O₅, und 6% K₂O; MANNA) nach Herstellerangaben verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde darauf pro Replikat und Genotyp von mindestens 10 Pflanzen und Blättern gleichen Alters gewonnen und sofort nach der Ernte schockgefroren. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy[®] Plant Mini Kit von Qiagen wie vom Hersteller beschrieben isoliert.

Für die anschließende Herstellung der Microarrays wurden 5 μg Gesamt-RNA von jeweils 10 Pflanzen prozessiert und auf einem GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array unter Gebrauch des One-Cycle Target Labeling und der Kontrollreagenzien gemäß der Instruktionen des Herstellers (Affymetrix[™]) hybridisiert.

Insgesamt wurden fünf Mutanten neben zwei Wildtypen analysiert. Die Mutante *psad1-1*, Ökotyp Columbia, zeigt eine Mutation in der D1 Untereinheit des Photosystems 1, während die Mutante *psae1-3* (Ökotyp: Wassilewskija) eine Mutation in der Untereinheit E1 aufweist. Bei der Mutante *stn7* handelt es sich um die gleiche Mutante wie bei Experiment 5. Bei der Doppelmutante *psad1-1*×*stn7* ist sowohl die Untereinheit D1 des Photosystems 1 als auch das Protein STN7 betroffen, bei der Doppelmutante *psae1-3*×*stn7* die Untereinheit E1 und das Protein STN7.

Von den Ansätzen *stn7* und *psad1-1*×*stn7* sind drei biologische Replikate, von den Ansätzen *psad1-1*, *psae1-3*, *psae1-3*×*stn7* und Wildtyp, Ökotyp Wassilewskija, zwei biologische Replikate und vom Ansatz Wildtyp, Ökotyp Columbia, fünf biologische Replikate vorhanden.

Eine Übersicht über die Experimente mit den jeweiligen Zeitpunkten der Probennahme ist in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Vergleiche, die in Absprache mit den jeweiligen Kooperationspartnern zwischen Mutante und Wildtyp oder unbehandeltem Wildtyp und behandeltem Wildtyp gezogen wurden. - Wt_{Col} : Wildtyp Ökotyp Columbia; Wt_{Was} : Wildtyp Ökotyp Wassilewskija; NN: Normallicht; LL: Schwachlicht; NH: Transfer Normallicht zu Hochlicht; LH: Transfer Schwachlicht zu Hochlicht; DM: Doppelmutante $adg1-1 \times tpt-2$; 2d: 2 Tage; h: Stunden; m: Minuten; RSP: ROS schützendes Protein

Experiment 1 (Tetrapyrrol- pfad)	Experiment 2 (Magnesiumche- latase)	Experiment 3 (RSP/Änderung der Lichtquali- tät)	Experiment 4 (Stärkesynthese und Triosephos- phattransport)	Experiment 5 (Redox-Signale)	Experiment 6 (Anpassung der Photosynthese)
$gum4 / Wt_{Col}$	$chld-1 / Wt_{Col}$	$Wt_{Col}(NN) /$ $Wt_{Col}(LL)$	$adg1-1(0) /$ $Wt_{Col}(0)$	$Wt_{Col}(30m) /$ $Wt_{Col}(0m)$	$psad1-1 / Wt_{Col}$
GAB / Wt_{Col}	$chlm-1 / Wt_{Col}$	$Wt_{Col}(NH) /$ $Wt_{Col}(LH)$	$adg1-1(2d) /$ $adg1-1(0)$	$Wt_{Col}(60m) /$ $Wt_{Col}(0m)$	$(psad1-1 \times stn7) /$ Wt_{Col}
$gum4 /$ GAB	$chlm-1 / chld-1$	$Wt_{Col}(NH) /$ $Wt_{Col}(NN)$	$adg1-1(2d) /$ $Wt_{Col}(2d)$	$Wt_{Col}(60m) /$ $Wt_{Col}(30m)$	$stn7 / Wt_{Col}$
		$Wt_{Col}(LH) /$ $Wt_{Col}(LL)$	$adg1-1(4h) /$ $adg1-1(0)$	$stn7(0m) /$ $Wt_{Col}(0m)$	$psae1-3 / Wt_{Was}$
		$rap2.4a(NN) /$ $rap2.4a(LL)$	$agd(4h) /$ $Wt_{Col}(4h)$	$stn7(30m) /$ $Wt_{Col}(30m)$	$((psae1-3 \times stn7) /$ $Wt_{Was}) / (Wt_{Col}$ $/ Wt_{Was})$
		$rap2.4a(NH) /$ $rap2.4a(LH)$	$Wt_{Col}(2d) /$ $Wt_{Col}(0)$	$stn7(60m) /$ $Wt_{Col}(60m)$	$(psae1-3 \times stn7) /$ Wt_{Was}
		$rap2.4a(NH) /$ $rap2.4a(NN)$	$Wt_{Col}(4h) /$ $Wt_{Col}(0)$	$stn7(30m) /$ $stn7(0m)$	
		$rap2.4a(LH) /$ $rap2.4a(LL)$	DM(0) / $Wt_{Col}(0)$	$stn7(60m) /$ $stn7(30m)$	
		$rap2.4a(NH) /$ $Wt_{Col}(NH)$	DM(2d) / $Wt_{Col}(2d)$	$stn7(60m) /$ $stn7(0m)$	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

5. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 5.1 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Experiment 1 (Tetrapyrrol- pfad)	Experiment 2 (Magnesiumche- latase)	Experiment 3 (RSP/Änderung der Lichtquali- tät)	Experiment 4 (Stärkesynthese und Triosephos- phattransport)	Experiment 5 (Redox-Signale)	Experiment 6 (Anpassung der Photosynthese)
		<i>rap2.4a</i> (NN) / <i>Wt_{Col}</i> (NN)	DM(2d) / DM(0)		
		<i>rap2.4a</i> (LH) / <i>Wt_{Col}</i> (LH)	DM(4h) / <i>Wt_{Col}</i> (4h)		
		<i>rap2.4a</i> (LL) / <i>Wt_{Col}</i> (LL)	DM(4h) / DM(0)		
			<i>tpt-2</i> (0) / <i>Wt_{Col}</i> (0)		
			<i>tpt-2</i> (2d) / <i>Wt_{Col}</i> (2d)		
			<i>tpt-2</i> (2d) / <i>tpt-2</i> (0)		
			<i>tpt-2</i> (4h) / <i>Wt_{Col}</i> (4h)		
			<i>tpt-2</i> (4h) / <i>tpt-2</i> (0)		

5.2 Microarray Hybridisierung und Datenanalyse

Die Microarray Analysen der Forschergruppe FOR804 basieren auf dem Affymetrix™ ATH1 Arabidopsis GeneChip. Bei allen Experimenten, bis auf Experiment 6, wurde die Qualitätskontrolle der RNA, Präparation der biotynilierten aRNA und Hybridisierung beim KFB Regensburg durchgeführt. Hierfür wurden das GeneChip® 3' IVT Express Kit sowie Standardprotokolle von Affymetrix™ herangezogen.

Alle Microarraydaten folgen in ihrer Beschreibung den *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) Leitlinien [Brazma et al., 2001] und sind unter folgenden Accession Nummern abrufbar, sofern bereits veröffentlicht:

Experiment 1	:	GSE27704
Experiment 2	:	GSE41884
Experiment 3	:	E-MTAB-1344
Experiment 4	:	unveröffentlicht
Experiment 5	:	GSE42710
Experiment 6	:	GSE15939

Zur Analyse der Gene des Grundmoduls bei unterschiedlichen Stimuli wurden, bis auf beim Zucker-Experiment von Dr. Iris Finkemeier, ebenfalls ATH1 Arabidopsis Gene-Chip Microarrays herangezogen:

ABA [Böhmer und Schroeder, 2011]	:	GSE23301
Auxin [Armstrong et al., 2004]	:	GSE1491
ROS anhand der <i>flu</i> -Mutante [Lee et al., 2007]	:	GSE10812
Gibberellin [Ribeiro et al., 2012]	:	E-GEOD-29699
Licht [González-Pérez et al., 2011]	:	GSE22671
Norflurazon [Koussevitzky et al., 2007]	:	GSM323075

Bei den Microarrays von Dr. Iris Finkemeier, die zur Zeit noch nicht veröffentlicht sind, handelt es sich um zweifarbige 29k Arabidopsis Oligonukleotid Microarrays, hergestellt im Labor von Prof. Galbraith (www.ag.arizona.edu/microarray, 2011). *A. thaliana* Pflanzen, Ökotyp Columbia, wurden 4 Wochen auf Erde mit Vermiculit bei 22°C und einer Photoperiode von 16 Stunden und einer Lichtintensität von 100-150 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ angezogen. Pro Replikat wurden 10-20 voll ausgebildete Blätter 4 Wochen alter *A. thaliana*-Pflanzen in 2mm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden nach Vakuum Filtration in 30 mM Sucrose oder MES Puffer als Kontrolle, 3 mal jeweils 5 Minuten, bei 100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ inkubiert. Alle verwendeten Lösungen für die Filtration

5. MATERIAL UND METHODEN

wurden in 1 mM MES, pH 5,5 (KOH), hergestellt. Für die anschließende Aufbereitung zur Microarray-Hybridisierung wurde Rosettenmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gesamt-RNA wurde mit dem TRIZOL[®] Reagenz (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) extrahiert. cDNA Präparation und Markierung wurde mithilfe des 3DNA Array 50 Kits[™] (Version 2, Genisphere Inc. Hatfield, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Cy3 oder Cy5 markierte cDNA Proben wurden anschließend auf dem Microarray hybridisiert. Vier biologische Replikate wurden mit jeweils zwei Inversionen der Fluoreszenzfarbstoffe, um asymmetrische Färbungen zu vermeiden, analysiert. Die Microarrays wurden mit einem Affymetrix[™] 428[™] Array Scanner und dessen Software nach Herstellerangaben gescannt. Die resultierenden Bilder wurden mit der Genepix[®] Pro Version 4.1 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bearbeitet. Die Rohdaten wurden mit der Express Converter Software (Version 1.9, Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA) konvertiert. Die anschließende lowess (locfit) Normalisierung wurde mit der MIDAS software (Version 2.19, Dana Faber Cancer Institute, Boston, MA, USA) ausgeführt. Elemente mit einer medianen Intensität kleiner als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der medianen Hintergrundsignale wurden verworfen. Duplikate wurden durch den mittleren Expressionswert mithilfe der FiRe macro Software [Beckers und Conrath, 2006; Garcion et al., 2006] ersetzt.

5.3 qPCR-Analysen

Das Pflanzenmaterial sowie die RNA-Gewinnung als Grundlage der qPCR-Analysen durchgeführt von Dr. Lars Dietzel sind in 5.1.5 beschrieben. Für die qPCR wurde 1 μ g Gesamt-RNA mittels Revert aid reverser Transkriptase (Thermo) und oligo-dT(18)-Primern nach Herstellerprotokoll umgeschrieben und 1/20 des Ansatzes wurde zur qPCR unter Verwendung des 2xSensiFast SYBR/lowROX Mastermix von Biorline in einem MX3000Pro Thermocycler von Stratagene-Agilent eingesetzt. Die anschließende Dokumentation und Auswertung erfolgte gemäß der *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) Richtlinien [Bustin et al., 2009]. Als Kontrolle diente beim Wildtyp der Wildtyp zum Zeitpunkt 0 Minuten, bei der Mutante die Mutante zum Zeitpunkt 0 Minuten.

Die qPCR-Analysen durchgeführt von Hagen Schlicke basierten auf Pflanzenmaterial

wie in 5.1.2 beschrieben. Für die Isolation der Gesamt-RNA wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in einem Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zweimal für 30 Sekunden bei Maximalfrequenz in der Schwingermühle aufgeschlossen. Das gefrorene, resultierende Pulver wurde mit 1 ml TRIsure™ (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) versetzt, homogenisiert und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 5-minütiger Inkubation auf Eis mit 250 µl Chloroform gevortext. Nach anschließender 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Phasentrennung mit einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13200 rpm und 4°C. Von der oberen, wässrigen Phase mit RNA wurden ca. 400 µl entnommen, mit 700 µl Isopropanol versetzt und die RNA für 20 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Die RNA wurde anschließend für 10 Minuten bei 13200 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das RNA-Pellet mit 70% Ethanol (1 ml) unter fünfminütiger Zentrifugation (13200 rpm, 4°C) gewaschen. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und in 40 µl H₂O_{dd} resuspendiert. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde die Probe 10 Minuten lang bei 65°C auf dem Heizblock erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Proben wurden vor Synthese der cDNA mit DNase behandelt, um restliche, eventuell noch vorhandene DNA zu verdauen. 2 µg RNA wurden mit H₂O_{dd} auf 8 µl aufgefüllt und mit 1 µl DNase I und 1 µl 10x Reaktionspuffer (Fermentas) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA (Fermentas) und Inkubation für 10 Minuten bei 65°C gestoppt. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend durch Zugabe von 4 µl 5x Puffer (Fermentas), 2 µl 10 µM dNTPs (Bioline), 2 µl 50 µM Oligo dT Primer (Bioline), 1 µl Reverser Transkriptase und 0,5 µl Ribo Lock (Fermentas), um RNasen zu blockieren. Die Synthese lief 1 Stunde bei 42°C und wurde durch 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die resultierenden cDNA-Proben wurden 1:3 mit H₂O_{dd} verdünnt und bei 4°C oder -20°C gelagert. Die anschließende Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Bio-Rad CFX Manager™. Die relative Expression bezog sich hierbei auf Verhältnis der CHLD-Mutante gegenüber dem Wildtyp.

5.4 Auswertung der Microarrays: Normalisierung und differenzielle Expression

Für die Auswertung der Microarrays wurde LIMMA [Smyth, 2004] sowie die TAIR9 Annotation (nmg-r.bioinformatics.nl/NuGO.R.html) verwendet. Bei LIMMA handelt es sich um ein R Paket, welches für die Analyse und Prozessierung von Microarrays geschrieben wurde und bei Bioconductor angeboten wird [Gentleman et al., 2004] (vgl. 1.3). Alle hier verwendeten Microarrays wurden mit *robust multi-array average expression measure* (RMA) [Irizarry et al., 2003] hintergrundkorrigiert und mit der quantilen Normalisierung normalisiert [Bolstad et al., 2003]. Differenzielle Expression wurde mithilfe eines empirischen Bayes linearen Modelles [Smyth, 2004] sowie den Kontrasten aus Tabelle 5.1 bestimmt. Der resultierende P-Wert der Analysen wurde mit dem Benjamini-Yekutieli-Verfahren [Benjamini und Yekutieli, 2001] korrigiert. Gene wurden dann als signifikant differenziell exprimiert angesehen, wenn ihr korrigierter P-Wert $\leq 0,05$ war und ihr *Foldchange* $\leq 2/3$ oder $\geq 3/2$ war. Diese Vorgehensweise der zweifachen Filterung differenziell regulierter Gene liefert eine deutlich reduzierte Fehlerrate gegenüber der einfachen Filterung nur auf Grund des logarithmischen *Foldchange* [Costigan et al., 2002].

Auch die publizierten Microarrays, bis auf die Zucker-Arrays von Dr. Iris Finkemeier, die zur Überprüfung der Induktion der Grundmodulgene durch verschiedene Signale herangezogen wurden (vgl. 5.2), wurden auf diese Weise ausgewertet. Die Zucker-Arrays lagen bereits mit der lowess Methode [Cleveland, 1979] normalisiert vor und wurden in LIMMA zur Bestimmung der differenziell exprimierten Gene geladen. Die nachfolgende Bestimmung der differenziellen Expression erfolgte wie eingangs beschrieben.

5.5 Venn Diagramm

Ein Venn Diagramm zeigt alle möglichen Überlappungen zwischen bestimmten Datensets auf. Hier wird es genutzt, um die Schnittmengen der differenziell regulierten Gene der einzelnen Experimente darzustellen und zu berechnen.

Für jeden Vergleich wurde eine Liste der signifikant differenziell exprimierten Gene aufgestellt. Anschließend wurden diese Listen für jedes Experiment, in dem diese Vergleiche

gezogen wurden, konkateniert, sodass eine Liste pro Experiment, basierend auf den einzelnen, ihm zugehörigen Vergleichen, erhalten wurde (vgl. Tabellen 2.1 und C2). Zur Berechnung der Schnittmengen dieser Listen wurde ein selbst geschriebenes Programm verwendet.

5.6 GO-Anreicherungsanalyse

Überrepräsentierte GO-Terme [Ashburner et al., 2000] in einem bestimmten Set an Genen wurden mithilfe eines von Dr. Georg Haberer geschriebenen Programmes berechnet. Die zu Grunde liegenden GO-Dateien stammen von www.geneontology.org (Mai 2010) in der TAIR9 Annotation. Die Berechnung basiert auf der hypergeometrischen Verteilung mit der hypergeometrischen Wahrscheinlichkeit H :

$$H = \frac{\binom{m}{k} \binom{N-m}{n-k}}{\binom{N}{n}} \quad (5.1)$$

wobei m die Wahrscheinlichkeit eines Erfolges ist, k die Gesamtsumme der Erfolge, N die Populationsgröße und n die Anzahl der Züge oder der Größe der zu prüfenden Genliste. Der resultierende P-Wert der Wahrscheinlichkeit H wurde mithilfe der Bonferroni Methode [Bonferroni, 1936; Shaffer, 1995] korrigiert. GO-Terme, die einen P-Wert von kleiner als 0,05 aufwiesen, wurden als signifikant betrachtet.

Bei GO-Anreicherungsanalysen der Grundmodulgene wurden alle Gene auf dem AffymetrixTM ATH1 Chip als Populationsgröße genommen, ebenso bei Anreicherungsanalysen der lateralen Module. Bei den Netzwerken stellten jeweils alle Gene bzw. Proteine des Subnetzwerkes die Populationsgröße dar.

5.7 *kmeans* Clustering

Alle Gene, die in mindestens drei Experimenten differenziell exprimiert waren, wurden anhand ihres logarithmisierten *Foldchanges* geclustert. Hierfür wurde der in R implementierte *kmeans*-Algorithmus [Hartigan und Wong, 1979] verwendet. Der Algorithmus ist auf eine vordefinierte Anzahl an Clustern angewiesen, die ähnlich einem Scree-Plot [Cattell, 1978] geschätzt werden können [Everitt und Hothorn, 2006]

5. MATERIAL UND METHODEN

(<http://www.statmethods.net/advstats/cluster.html>, 2010). Es wurden 22 Cluster geschätzt, allerdings sind die Cluster recht unscharf voneinander getrennt (s. Abb. B.6). Daher wurde die Anzahl der Cluster schrittweise auf 15 reduziert, da hier eine bessere Aufteilung der Cluster erreicht werden konnte.

Anschließend wurde *kmeans* mit 15 Clustern, der maximalen Anzahl an Iterationsschritten mit 4895, die der Gensumme entsprechen, und 25 randomisierten Startsets ausgeführt.

5.8 Motivsuche

Für die Motivsuche wurde der Algorithmus FIRE [Elemento et al., 2007] verwendet. FIRE basiert auf dem Konzept der Transinformation $I(X; Y)$:

$$I(X; Y) = \sum_{(x \in X, y \in Y)} p(x, y) \log \left(\frac{p(x, y)}{p(x)p(y)} \right) \quad (5.2)$$

mit X, Y als Zufallsvariablen, $p(x, y)$ als multivariate Wahrscheinlichkeitsverteilung von X und Y und $p(x)$ bzw. $p(y)$ den Randverteilungsfunktionen von x und y . Des Weiteren nutzt FIRE bei der Auswertung der über- bzw. unterrepräsentierten *cis*-Elementen die JASPAR-Datenbank [Sandelin et al., 2004] von Promoterelementen. Der Grenzwert, ab dem FIRE ein Motiv aufzeigt, kann vom Nutzer eingestellt werden. Einfache Motive werden von FIRE in K-meren organisiert, sodass der Nutzer Motive verschiedener K-mer-Größen gezielt suchen lassen kann.

FIRE bietet verschiedene Vorteile gegenüber anderen Motivsuchen wie z.B. ATHENA [O'Connor et al., 1995]. So macht FIRE nur geringe Annahmen über den genetischen Hintergrund eines Organismus' und keine Annahmen über die Verteilung möglicher *cis*-Elemente. Auch können neben überrepräsentierten Motiven in einem bestimmten Set an Genen ebenso unterrepräsentierte Motive dargestellt werden. Des Weiteren ist FIRE durch die implementierten Möglichkeiten der kontinuierlichen und diskreten Analysen, bei denen Gene entweder durch einen FIRE-internen Algorithmus anhand ihrer Expression geclustert werden oder extern als Cluster vorliegen, speziell auf Transkriptomdaten ausgelegt.

In dieser Arbeit wurde FIRE mit einer 2kb upstream Promoterdatenbank, basierend

auf der TAIR9 Annotation, verwendet. Da die Gene, die auf regulatorische Elemente untersucht wurden, anhand des Venn Diagramms und anhand der *kmeans* Analysen schon geclustert wurden, wurde FIRE in einem diskreten Ansatz verwendet. Die Robustheit der Motive wurde hierbei auf 6, der Standardeinstellung, belassen. Motive der K-mer-Größen von 3 bis 10 wurden untersucht.

5.9 Pfadanalysen

Jeder Cluster der Gene, die in mindestens drei Experimenten signifikant differenziell exprimiert waren, wurde mithilfe von PPI Spider, KEGG Spider und R Spider [Antonov et al., 2009; Antonov et al., 2008; Antonov et al., 2010] auf metabolische Pfade untersucht [Antonov, 2011]. Als Populationsgröße wurde das *A. thaliana* Genom in TAIR9 Annotation verwendet. Nur Pfade, die einen P-Wert von $\leq 0,05$ zeigten, wurden in die Auswertung miteinbezogen.

5.10 PPI-Netzwerke

Die Grundmodulgene wurden auf PPI-Netzwerke, basierend auf Y2H-Daten [Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011], ANAP [Wang et al., 2012] und AraNet [Lee et al., 2010], abgebildet und ein Subnetzwerk mit den Grundmodulgenen sowie deren direkten Interaktionspartnern (ANAP, AraNet) oder auch ihren indirekten Interaktionspartnern bis zum dritten Grad (Y2H) mithilfe eines Python Scripts aufgebaut. Bei Genen der lateralen Module wurden ebenfalls die direkten Interaktionspartner zum Aufbau des Subnetzwerkes genutzt. Das EXCERBT-Netzwerk wurde von Benedikt Wachinger mit den Genen der lateralen Modulen sowie deren direkten Interaktionspartnern aufgebaut. Anschließend wurden Verknüpfungsgruppen im Subnetzwerk mithilfe des *linkcomm*-Algorithmus' [Kalinka und Tomancak, 2011] in R mit Standardeinstellungen bestimmt. Gruppen, die aus mindestens 5 Proteinen bestanden, wurden mithilfe einer GO-Anreicherungsanalyse (vgl. 5.6) untersucht und die resultierenden Terme kategorisiert. Zusätzlich wurden diese Gruppen auf Zielgene von miRNAs untersucht. Hierfür

5. MATERIAL UND METHODEN

wurde eine Liste maturer *A.thaliana* miRNA Sequenzen, TAIR9, von MiRBase [Kozomara und Griffith-Jones, 2011] heruntergeladen und mithilfe von psRNATarget [Dai und Zhao, 2011] mit den folgenden Standardeinstellungen nach Zielgenen gescannt:

1. Maximalerwartung: 3,0
2. Komplementärlänge: 20
3. Maximalenergie der Entpaarung der Zielseite (*maximum energy to unpair the target site*): 25
4. flankierende Sequenz: 17 bp upstream, 13 bp downstream
5. Mismatchbereich: 9-11 Nukleotide

Die resultierende Liste der Zielgene wurde dann mit den Genen in den gefilterten Verknüpfungsgruppen abgeglichen. Die abschließende Darstellungen des Netzwerkes erfolgte mit Cytoscape [Shannon et al., 2003].

Anhang A

Tabellen

Tabelle A.1: Sequenzen der verwendeten Primer zur Überprüfung der Expression einiger Gene im Kernantwortmodul anhand einer qPCR, durchgeführt von Dr. Lars Dietzel. - Die Sequenzen der Primer sowie ihre Effizienz ist bei den jeweiligen Genen dargestellt.

Gen	Forward Sequenz	Backward Sequenz	Effizienz [%]
STP1 (At1g11260)	CTACGCTTGTTTCTATCTACGG	CCAAACGGGAAGATTTCACCTC	80
MEE14 (At2g15890)	GAACTCAAAGATCTCGAAAAGAG	GGGATAGTTCCTTTACTTCTAAGC	75
IAA2 (AT3g23030)	GAAGAATCTACACCTCCTACC	AACATCACCAACCAACATCC	79
LSU2 (At5g24660)	GTGGAGGAGATGAAGAAAGAG	TGAGAAAGATGATACGAGAGTG	51
ATTPA (At5g51460)	GTATCCATCAGCTCTTACCT	CAAATCATACACCTTATCCC	79

Tabelle A.2: Sequenzen der verwendeten Primer zur Überprüfung der Expression einiger Gene im Kernantwortmodul anhand einer qPCR, durchgeführt von Hagen Schlicke. - Die Sequenzen der Primer sind bei den jeweiligen Genen dargestellt.

Gen	Forward Sequenz	Backward Sequenz
AT1G49230	TTAAACTCTACTCAACCACCAC	ACCTAAACCAGCGTATCCA
AT4G28270	GTGTGGTATGCCGAAATGGT	GACTCTGCTTAATGACTCCTC
HIS1-3 (AT2G18050)	ACCACCAAGATGATAACGAG	CGCCTTCTTCACCTTTCCT
AT4G34770	AGAGATTTGTGATACCTATATCGT	GAACCCGAACTCTTCTTCC
CCL (AT3G26740)	CGACTATAACTCCCTCCATCCT	ATTCTCTGTCAACGGGCT
IAA29 (AT4G32280)	GAATATGAAGATTGCCGACAGAG	GAAGTAGCCAGTCACCCCT
AT3G62950	CATCAAGACGCTATTCTACGA	ATGTACCTTCCCTCCAACGA
WRR4 (AT1G56510)	CAGAGGCAATAAAGAGGGAG	GATACGGATTCAATAGTCACCA
LAX3 (AT1G77690)	ATATGCTTACCCTTTGCTCCTG	CCCATCCATCCTCCTACC
AT5G64640	CGGTGATGGATTTATGGCT	TTTGTAGAACTGACGGGAGAG
AT3G15630	CAAATCCTTAATCTTCTCTTCTTCC	ATGATTGTAGCCATTGTTAGGT
DNAJ (AT2G17880)	ATTTCTCATCTCAAAATCACACTG	GTAGCGAAGAAGGTTGGG
AT3G44450	GGCTAAAGAGACATAGAGAAGAG	TCCATCCATCCCATAAAGCA

A. TABELLEN

Tabelle A.3: Charakterisierung der Gene im Kernantwortmodul anhand der Literatur.

Locus	Charakteristika	Literatur
AT1G11260	Zuckertransporter Antwortet auf Salzstress	[Sharma et al., 2007] [Hsu et al., 2009]
AT1G49230	ABA-, zyklische ADP-Ribose (<i>cyclic ADP-ribose</i>) (cADPR)-induzierbar Induzierbar durch ROS?	[Sánchez et al., 2004] [Charron et al., 2008]
AT1G56510	Krankheitsresistenz Induzierbar durch Salicylsäure	[Zheng et al., 2006] [Tan et al., 2007]
AT1G63180	Zucker-induzierbar Zellwandstruktur, Wachstum Hitze-induzierbar	[Nicolai et al., 2006] [Mølhøj et al., 2004]; [Seifert et al., 2002]; [Rösti et al., 2007] [Busch et al., 2005]
AT1G66100	ABA-induzierbar	[Osakabe et al., 2005]
AT1G68440	Induzierbar durch oxidativen Stress Induzierbar durch Sucrose nach Hungern	[Baxter et al., 2007] [Nicolai et al., 2006]
AT1G77690	Auxin Influx-Carrier Involviert bei der Zellformierung im Apex, Krümmungsentwicklung	[Ugartechea-Chirino et al., 2010]; [Vandenbussche et al., 2010]; [Swarup et al., 2008]
Fortsetzung auf der nächsten Seite		

Tabelle A.3 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Charakteristika	Literatur
AT2G05540	Zellwandkomponente Stress- und ABA-induzierbar	[Ringli et al., 2001]; [Martínez und Chrispeels, 2003] [Suzuki et al., 2005; Xin et al., 2005]
AT2G14660	Unbeschrieben	
AT2G15890	Stress- und ABA-induzierbar Induzierbar durch APETALA3	[Leonhardt et al., 2004]; [Bräutigam et al., 2009] [Zik und Irish, 2003]
AT2G17880	Reaktiv auf Zucker nach Hungern Vermittelt Toleranz zu oxidativem Stress?	[Usadel et al., 2008] [Chen et al., 2010]
AT2G18050	Stress- und ABA-induzierbar Induzierbar durch Trockenheit Induzierbar durch Zucker nach Hungern Induzierbar durch cADPR	[Fujita et al., 2005] [Ascenzi und Gantt, 1997] [Osuna et al., 2007] [Sánchez et al., 2004]
AT3G15630	Reaktiv auf Zucker nach Hungern Zellwandmodifikation ROS Stress-sensibel	[Usadel et al., 2008] [Jakoby et al., 2008] [Boyce et al., 2003]
AT3G23030	Auxin-induzierbar	[Overvoorde et al., 2005]
AT3G26740	Induzierbar durch Calcium	[Kaplan et al., 2006]
AT3G29030	Zellwandmodifikation ROS-induzierbar	[Li et al., 2002] [Davletova et al., 2005]
Fortsetzung auf der nächsten Seite		

A. TABELLEN

Tabelle A.3 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Charakteristika	Literatur
AT3G44450	ROS-induzierbar Induzierbar durch Zucker nach Hungern	[Brown et al., 2005] [Usadel et al., 2008]
AT3G47420	Induzierbar durch anorganisches Phosphat (P_i)-Mangel	[Bari et al., 2006]
AT3G62950	Redox-Signale Induzierbar durch Salzstress Verteidigungsreaktion?	[Rouhier et al., 2008]; [Nagata et al., 2005]; [Kasukabe et al., 2004] [Sottosanto et al., 2004] [Sattler et al., 2006]
AT4G04630	Unbeschrieben	
AT4G17245	Induzierbar durch die SWITCH/SUCROSE NONFERMENTABLE (SWI/SNF)-ATPasen BRAHMA und SPLAYED	[Bezhani et al., 2007]
AT4G19380	Zellwand Verteidigungsreaktion?	[Kachroo und Kachroo, 2009]
AT4G28270	Auxin-induzierbar Trockenstress	[Huang et al., 2008] [Son et al., 2010]
AT4G32280	Auxin-induzierbar	[Overvoorde et al., 2005]
AT4G34770	Auxin-induzierbar Sensibel auf Kälte	[Schwager et al., 2007] [Lee et al., 2005]
AT4G39030	Verteidigungsreaktion, involviert im Salicylsäurepfad ROS-induzierbar	[Nawrath et al., 2002] [Ogawa et al., 2007]
AT5G02760	Stress- und ABA-induzierbar	[Xue et al., 2008]
Fortsetzung auf der nächsten Seite		

Tabelle A.3 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Charakteristika	Literatur
	Auxin-induzierbar Induzierbar durch Zucker Induzierbar durch Calcium	[Zhao et al., 2003] [Osuna et al., 2007] [Sugimoto et al., 1997]
AT5G08350	Induzierbar durch Zucker ABA- und REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)-induzierbar	[Usadel et al., 2008] [Efetova et al., 2007]; [Hou et al., 2008]; [Jiang et al., 2008]
AT5G17860	Interaktion mit Calcium ABA-induzierbar Reguliert durch RGA Induzierbar durch Zucker nach Hungern	[Delk et al., 2005] [Efetova et al., 2007] [Hou et al., 2008] [Usadel et al., 2008]
AT5G19120	Antwortet auf ROS Kälte-induzierbar Induzierbar durch APETALA3 Induzierbar durch Zucker nach Hungern	[Nagata et al., 2005] [Kasukabe et al., 2004] [Zik und Irish, 2003] [Usadel et al., 2008]
AT5G20250	Antioxidant Induzierbar durch Zucker	[Nishizawa et al., 2008] [Fujiki et al., 2000]
AT5G21170	Antwortet auf Zuckermangel ABA-induzierbar	[Li et al., 2009] [Jossier et al., 2009]; [Hey et al., 2010]
AT5G22920	Antwortet auf Zuckermangel	[Usadel et al., 2008]
Fortsetzung auf der nächsten Seite		

A. TABELLEN

Tabelle A.3 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Charakteristika	Literatur
	RGA-induzierbar	[Hou et al., 2008]
AT5G24660	Induzierbar durch ROS? Sensitiv auf Schwefelmangel Induzierbar durch Zucker nach Hungern	[Davletova et al., 2005] [Lewandowska et al., 2010] [Usadel et al., 2008]
AT5G37770	Interaktion mit Calcium, ABA- und Auxin-induzierbar, eventuell involviert in Redox-Signale, induzierbar durch ROS	[Delk et al., 2005]
AT5G51460	Involviert in Entwicklungsprozesse Durch Trehalose-6-phosphat (T6P) an der Zellwandmodifikation beteiligt, Verteidigungsreaktion	[Vogel et al., 1998] [Schluepmann et al., 2004]
AT5G63190	Induzierbar durch Stress	[Sharma et al., 2007]
AT5G64640	Zellwandmodifikation	[Louvet et al., 2006]
AT5G67420	Organentwicklung, induzierbar durch Stress	[Shuai et al., 2002]

Tabelle A.4: Regulatorische Elemente im Grundmodul. - Fraktion der Gene in jeder Schnittmenge, die eine Über- oder Unterrepräsentierung eines bestimmten Motives zeigen.

Motiv	K- mer Größe	Positiv/negativ aktive Schnitt- mengen	Fraktion in positiv aktiven Schnittmengen	Fraktion in negativ aktiven Schnittmengen
TCGC[A T]	3	21/ 25, 39	0,944	0,670; 0,665
TCATG.	4	46/ 25, 39	0,91	0,747; 0,745
.CATGA.	5	46/ 25, 39	0,91	0,747; 0,745
TATATAT.	6	5, 13, 31, 45, 46/ 25, 39	0,886; 0,950; 0,846; 0,860; 0,775	0,526; 0,537
.ATATATA.	7	5, 13, 31, 45, 46/ 25, 39	0,886; 0,950; 0,846; 0,860; 0,775	0,526; 0,537

A. TABELLEN

Tabelle A.5: CGF1ATCAB2 als Element der Gene des Kernantwortmoduls.

- Sequenzen des CGF1ATCAB2 Motivs, die in den Grundmodulgenen vorhanden sind. Ein X markiert das Vorhandensein einer bestimmten Sequenz in der Promoterregion eines bestimmten Loci.

Locus	Kurzbeschreibung nach TAIR9	TATATAT	ATATATA
AT1G11260	STP1 (SUGAR TRANSPORTER 1)	x	x
AT1G49230	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	x	x
AT1G56510	WRR4 (WHITE RUST RESISTANCE 4)	x	
AT1G49230	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	x	x
AT1G63180	UGE3 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 3)	x	x
AT1G68440	Unknown protein	x	x
AT2G05540	Glycine-rich protein	x	
AT2G14660	Unknown protein	x	x
AT2G15890	MEE14 (maternal effect embryo arrest 14)	x	x
AT2G17880	DNAJ heat shock protein, putative	x	x
AT2G18050	HIS1-3 (HISTONE H1-3)	x	x
AT3G15630	Unknown protein	x	x
AT3G23030	IAA2 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 2)	x	x
AT3G29030	EXPA5 (EXPANSIN A5)	x	x
AT3G44450	Unknown protein	x	x
AT3G47420	Glycerol-3-phosphate transporter, putative	x	x
AT3G62950	Glutaredoxin family protein	x	x
AT4G04630	Unknown protein	x	x
AT4G19380	Alcohol oxidase-related	x	x
AT4G28270	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	x	x
AT4G32280	IAA29 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29)	x	x
AT4G34770	Auxin-responsive family protein		x
AT4G39030	EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5)	x	x
AT5G02760	PP2C family protein	x	x
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

Tabelle A.5 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Kurzbeschreibung nach TAIR9	TATATAT	ATATATA
AT5G08350	GRAM domain-containing protein / ABA-responsive protein-related	x	x
AT5G17860	CAX7 (calcium exchanger 7)	x	x
AT5G19120	Aspartic-type endopeptidase	x	x
AT5G21170	5'-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit, putative	x	x
AT5G24660	LSU2 (RESPONSE TO LOW SULFUR 2)	x	x
AT5G37770	TCH2 (TOUCH 2)	x	x
AT5G51460	ATTPPA	x	x
AT5G67420	LBD37 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 37)	x	x

Tabelle A.6: miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf dem Y2H-Datensatz sowie den Grundmodulgengen und ihren indirekten Interaktionspartnern verknüpft sind. - Ihre Einordnung bezieht sich auf ihre Sequenzähnlichkeit und der Sequenz der unreifen miRNAs [Griffiths-Jones, 2003].

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR156a	ath-miR837-3p	ath-miR417
ath-miR156b	ath-miR863-3p	ath-miR773
ath-miR156c	ath-miR863-5p	ath-miR779
ath-miR156d	ath-miR5015b	ath-miR783
ath-miR156e	ath-miR5024-3p	ath-miR830
ath-miR156f		ath-miR847
ath-miR156g		ath-miR852
ath-miR156h		ath-miR855
ath-miR156i		ath-miR858
ath-miR156j		ath-miR2937
ath-miR157a		ath-miR4221
ath-miR157b		ath-miR5016
ath-miR157c		ath-miR5637
ath-miR157d		ath-miR5641
ath-miR160a		ath-miR5650
ath-miR160b		ath-miR5652
ath-miR160c		ath-miR5655
ath-miR165a		ath-miR5665
Fortsetzung auf der nächsten Seite		

A. TABELLEN

Tabelle A.6 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR165b		
ath-miR166a		
ath-miR166b		
ath-miR166c		
ath-miR166d		
ath-miR166e		
ath-miR166f		
ath-miR166g		
ath-miR169d		
ath-miR169e		
ath-miR169f		
ath-miR169g		
ath-miR172a		
ath-miR172b		
ath-miR172c		
ath-miR172d		
ath-miR172e		
ath-miR397b		
ath-miR399e		
ath-miR833b		
ath-miR2111a		
ath-miR2111b		

Tabelle A.7: Kategorien, die im Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten sowie den Grundmodulgenen vertreten sind. - Beteiligung der Grundmodulgene an den Kategorien des Subnetzwerkes basierend auf Y2H-Daten sowie die Anzahl der Gruppen, die einer bestimmten Kategorie angehören. Das Subnetzwerk basiert auf den Grundmodulgenen sowie deren indirekten Interaktionspartnern.

Kategorie	Gruppen	Grundmodulgen
Translation, Ribosom, mRNA Prozessierung	6	AT2G17880 (DNAJ)
Redox Homöostase	6	
Auxin, Transkription	5	AT3G23030 (IAA2)
Transkription, Genexpression	5	
Fortsetzung auf der nächsten Seite		

Tabelle A.7 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Kategorie	Gruppen	Grundmodulgen
Transport, Regionalisierung, Komponentenorganisation	4	
Transkription, Entwicklung	4	
Photosynthese	3	
Phosphorylierung	3	
Calcium, Wassermangel	2	
Chloroplast, Mitochondrium	2	AT5G20250 (DIN10)
Hitzeschockprotein	2	AT2G17880 (DNAJ)
Vakuole, Kationtransport, ATPase Aktivität, Ribonukleotid	1	
Hydrolyase, Stickstoffkomponentenbiosynthese	1	
Kinase	1	
Nukleosidtriphosphatase	1	
Zink-Ion-Bindung, Ligase	1	AT4G28270 (Zinc finger)
Homodimerisation, Antwort auf Pilz	1	
Kleines Molekül metabolischer Prozess	1	
Transkription, Jasmonsäure, Salicylsäure	1	
Antwort auf anderen Organismus	1	
Bindung	1	
Isomerase Aktivität	1	
Zellzyklus, Enzymregulation	1	
Signalgebung	1	

A. TABELLEN

Tabelle A.8: miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf ANAP sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern verknüpft sind. - Ihre Einordnung bezieht sich auf ihre Sequenzähnlichkeit und der Sequenz der unreifen miRNAs [Griffiths-Jones, 2003].

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR160a ath-miR160b ath-miR160c ath-miR167c ath-miR858 ath-miR858b ath-miR774b	ath-miR5024-3p	ath-miR415 ath-miR419 ath-miR824 ath-miR831 ath-miR4221 ath-miR5652 ath-miR5655 ath-miR5658

Tabelle A.9: Kategorien, die im Subnetzwerk basierend auf ANAP sowie den Grundmodulgenen vertreten sind. - Beteiligung der putativen Grundmodulgene an den Kategorien des Subnetzwerkes basierend auf ANAP sowie die Anzahl der Gruppen, die einer bestimmten Kategorie angehören. Das Subnetzwerk basiert auf den Grundmodulgenen sowie deren direkten Interaktionspartnern.

Kategorie	Beteiligtes Grundmodulgen (Beschreibung nach TAIR9)
Transporteraktivität	AT3G29030 (EXP5)
Ribosom	AT5G24660 (LSU2)
Chloroplast	AT1G63180 (UGE3)
Proteinfaltung, Hitzeschockproteinbindung	AT2G17880 (DNAJ)
Zelltod, Phosphorylierung, Abwehrreaktion, Proteinmodifikation, Membran, Kinase, Signalvermittler, Phosphotransferase, Rezeptoraktivität	AT1G56510 (WRR4)
Abwehrantwort, Stressantwort, Jasmonsäure, Ethylen, Aromatische Komponenten biosynthetischer Prozess, Antwort auf Bakterium und Pilz, Carboxylsäure biosynthetischer Prozess, Salicylsäure	AT4G39030 (EDS5)
Transkription, Auxin, Tropismus, Entwicklung, Nukleus	AT3G23030 (IAA2)
Transkription, Auxin	AT4G32280 (IAA29), AT5G02760 (PP2C)
Zellwand, Carbohydrat metabolischer Prozess	AT5G22920 (Zinc finger), AT1G11260 (STP1)
Katabolischer Prozess	AT5G21170 (AKINBETA1)
Antwort auf Kälte, ABA	AT3G26740 (CCL)
Disaccharid metabolischer Prozess	AT3G15630 (Unknown protein)

A. TABELLEN

Tabelle A.10: miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern verknüpft sind. - Ihre Einordnung bezieht sich auf ihre Sequenzähnlichkeit und der Sequenz der unreifen miRNAs [Griffiths-Jones, 2003].

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR168a	ath-miR447c-3p	ath-miR414
ath-miR168b	ath-miR833-3p	ath-miR415
ath-miR169a	ath-miR835-5p	ath-miR417
ath-miR169b	ath-miR837-3p	ath-miR418
ath-miR169c	ath-miR863-3p	ath-miR419
ath-miR169d	ath-miR863-5p	ath-miR472
ath-miR169e	ath-miR865-3p	ath-miR776
ath-miR169f	ath-miR866-3p	ath-miR780
ath-miR169g	ath-miR868-3p	ath-miR782
ath-miR169h	ath-miR868-5p	ath-miR826
ath-miR169i	ath-miR2934-3p	ath-miR829
ath-miR169j		ath-miR831
ath-miR169k		ath-miR834
ath-miR169l		ath-miR842
ath-miR169m		ath-miR843
ath-miR169n		ath-miR846
ath-miR171b		ath-miR852
ath-miR171c		ath-miR856
ath-miR395a		ath-miR2938
ath-miR395b		ath-miR3933
ath-miR395c		ath-miR4221
ath-miR395d		ath-miR5012
ath-miR395e		ath-miR5021
ath-miR395f		ath-miR5026
ath-miR397a		ath-miR5029
ath-miR405a		ath-miR5631
ath-miR405b		ath-miR5633
ath-miR405d		ath-miR5636
ath-miR447a		ath-miR5639
ath-miR773		ath-miR5641
ath-miR773b		ath-miR5647
ath-miR774b		ath-miR5650
ath-miR781		ath-miR5654
ath-miR781b		ath-miR5657
ath-miR858		ath-miR5658
ath-miR858b		ath-miR5662

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.10 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR2111a ath-miR2111b ath-miR3932a ath-miR3932b ath-miR5015b ath-miR5020c ath-miR5630a ath-miR5630b		ath-miR5663

Tabelle A.11: Kategorien, die im Subnetzwerk basierend auf AraNet sowie den Grundmodulgenen vertreten sind. - Beteiligung der Grundmodulgene an den Kategorien des Subnetzwerkes basierend auf AraNet sowie die Anzahl der Gruppen, die einer bestimmten Kategorie angehören. Das Subnetzwerk basiert auf den Grundmodulgenen sowie deren direkten Interaktionspartnern.

Kategorie	Beteiligtes Grundmodulgen (Beschreibung nach TAIR9)
Zucker:Hydrogen Symporter, Phosphat-transmembrantransporter	AT3G47420 (G3P)
Galaktose/Lignin/Hexose Metabolismus, Mikrosporogenese, Zellzyklus, Oxidoreduktase, UDP-Glycosyltransferase, Racemase, Epimerase Aktivität	AT1G63180 (UGE3)
Trehalose Metabolismus	
Zuckerbindung, Zellwand	AT5G19120 (Aspartic-type endopeptidase)
Jasmonsäure, Ethylen, Salicylsäure, Gibberellin, ABA, Auxin, Transkription, Kälte	AT1G68440 (Unknown protein), AT4G04630 (Unknown protein)
Chromosomenorganisation, Chromatinaufbau, DNA Konformationsänderung	AT2G18050 (HIS1-3)
Transkription, Antwort auf Verwundung	AT5G37770 (TCH2)
Translationale Elongation, Ribosom, Genexpression	AT5G22920 (Zinc finger)
Fortsetzung auf der nächsten Seite	

A. TABELLEN

Tabelle A.11 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Kategorie	Beteiligtes Grundmodulgen (Beschreibung nach TAIR9)
Disulfidoxidoreduktase, Elektronentransporter, NAD/NADH Bindung, Methyltransferase, Redox Homöostase, Alditol metabolischer Prozess, Myristoylierung, Lipidierung, Organophosphat	AT3G62950 (Glutaredoxin)
Amintransmembrantransporter	AT1G77690 (LAX3)
Tryptophan/Indolalkylamin/Chorismat Metabolismus, Antwort auf Bakterium, Anthranilatsynthase, Oxidoreduktase, Transferaseaktivität, Transport, Calcium-Ion Bindung, Endoplasmatisches Reticulum (ER)	AT4G39030 (EDS5)
Mitochondrieller Atmungskettenkomplex III, Oxidative Phosphorylierung, Oxidoreduktase	AT2G14660 (Unknown protein)
Thylakoid	AT2G15890 (MEE14)
FAD-Bindung, Alkohol metabolischer Prozess, Endomembran, Carbon-Carbon-Lyase, Oxidoreduktase, Purinnukleosidbindung	AT4G19380 (Alcohol oxidase-related)
Proteolyse, Ubiquitinierung	AT4G17245 (Zinc finger)
Proteolyse, Ubiquitinierung, Stärke/Glucan Katabolismus	AT1G49230 (Zinc finger)
Transkription, Auxin	AT3G23030 (IAA2)
Kälte, Osmotischer Stress	AT3G26704 (CCL)
Zellwand, Lactose, Galactosidase Aktivität	AT5G20250 (DIN10)
Verschiedene	AT2G17880 (DNAJ), AT1G56510 (WRR4), AT5G02760 (PP2C), AT2G05540 (Glycine-rich protein), AT5G21170 (AKINBETA1)

Tabelle A.12: Kategorien, die durch GO-Anreicherungsanalyse der einzelnen Gruppen in den Subnetzwerken basierend auf den Grundmodulgenen festgelegt wurden. - Die einzelnen Kategorien der Netzwerke basierend auf Y2H-Daten, ANAP und AraNet wurden möglichen biologischen Prozessen zugeordnet. Die Kategorie *Verschiedene*, welche beim Subnetzwerk basierend auf AraNet auftritt (vgl. Tabelle A.11), wurde für diese Auswertung nicht herangezogen.

Prozess	Unterkategorie	Y2H	ANAP	AraNet
Translation	Translation	x		
	Translationale Elongation			x
	Ribosom	x	x	x
Transkription	Transkription	x	x	x
	mRNA Prozessierung	x		
	Genexpression	x	x	
	Nukleus		x	
	Chromosomenorganisation			x
	Chromatinaufbau			x
	DNA Konformationsänderung			x
	Purinnukleosidbindung			x
	Ribonukleotid	x		
Auxin	Auxin	x	x	x
Transport	Transport	x		x
	Transporteraktivität		x	
	Regionalisierung	x		
	Amintransmembrantransporter			x
	ER			x
	Kationtransport	x		
Komponentenorganisation	Komponentenorganisation	x		
Wachstum	Entwicklung	x	x	
	Tropismus		x	
	Mikrosporogenese			x
	Zellzyklus	x		x
	Gibberellin			x
Chloroplast und chloroplastidäre Prozesse	Chloroplast	x	x	
	Photosynthese	x		
	Thylakoid			x
Calcium	Calcium	x		
Fortsetzung auf der nächsten Seite				

A. TABELLEN

Tabelle A.12 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Prozess	Unterkategorie	Y2H	ANAP	AraNet
	Calcium-Ion-Bindung			x
Zink	Zink-Ion-Bindung	x		
Stress	Wassermangel	x		
	Zelltod		x	
	Stressantwort		x	
	Antwort auf Kälte		x	
	Kälte			x
	Osmotischer Stress			x
	ABA		x	x
Proteinmodifikation	Hitzeschockprotein	x		
	Hitzeschockproteinbindung		x	
	Proteinfaltung		x	
	Proteinmodifikation		x	
	Myristoylierung			x
	Lipidierung			x
	Proteolyse			x
	Ubiquitinierung			x
Phosphorylierung	Phosphotransferase		x	
	Phosphorylierung	x	x	
	Organophosphat			x
	Oxidative Phosphorylierung			x
	Phosphattransmembrantransporter			x
	Nukleosidtriphosphatase	x		
Signalgebung	Signalvermittler		x	
	Rezeptoraktivität		x	
	Signalgebung	x		
Zucker	Carbohydrat metabolischer Prozess		x	
	Dissaccharid metabolischer Prozess		x	
	Zucker:Hydrogen Symporter			x
	Galaktose, Lignin, Hexose Metabolismus			x
	UDP-Glycosyltransferase			x
	Trehalose Metabolismus			x
	Zuckerbindung			x
Fortsetzung auf der nächsten Seite				

Tabelle A.12 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Prozess	Unterkategorie	Y2H	ANAP	AraNet
	Stärke, Glucan Katabolismus			x
	Lactose			x
	Galactosidase Aktivität			x
Elektronenpool	Elektronentransporter			x
	NAD, NADH Bindung			x
	FAD-Bindung			x
Redox	Oxidoreduktase			x
	Disulfidoxidoreduktase			x
	Redox Homöostase	x		x
Mitochondrium	Mitochondrium	x		
	Mitochondrialer Atmungskettenkomplex III			x
Ethylen	Ethylen		x	x
Zellwand	Zellwand		x	x
Abwehr	Abwehrreaktion		x	
	Jasmonsäure		x	x
	Antwort auf Bakterium und Pilz		x	
	Antwort auf Bakterium			x
	Salicylsäure		x	x
	Antwort auf Verwundung			x
Sonstige	Membran		x	
	Kinase		x	
	Aromatischer Komponenten biosynthetischer Prozess		x	
	Katabolischer Prozess		x	
	Carboxylsäure biosynthetischer Prozess		x	
	Racemase, Epimerase Aktivität			x
	Methyltransferase			x
	Alditol metabolischer Prozess			x
	Tryptophan, Indolalkylamin, Chorismat Metabolismus			x
	Anthranilatsynthase			x
	Transferaseaktivität			x
	Fortsetzung auf der nächsten Seite			

A. TABELLEN

Tabelle A.12 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Prozess	Unterkategorie	Y2H	ANAP	AraNet
	Alkohol metabolischer Prozess			x
	Endomembran			x
	Carbon-Carbon-Lyase			x
	Vakuole	x		
	ATPase Aktivität	x		
	Hydrolase	x		
	Stickstoffkomponenten-biosynthese	x		
	Homodimerisation	x		
	Kleines Molekül metabolischer Prozess	x		
	Bindung	x		
	Ligase	x		
	Isomerase Aktivität	x		
	Enzymregulation	x		
	Verschiedene			x

Tabelle A.13: Einteilung der Grundmodulgene anhand ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Gruppen in den Subnetzwerken, welche auf den Grundmodulgenen sowie ihren direkten und indirekten Interaktionspartnern basieren. - Dargestellt ist die Beteiligung der Grundmodulgenen an Modulen der verschiedenen Netzwerke basierend auf Y2H-Daten, ANAP und AraNet.

Locus	Y2H	ANAP	AraNet
AT1G11260 (STP1)		Zellwand, Carbohydrat metabolischer Prozess	
AT1G49230 (Zinc finger)			Proteolyse, Ubiquitinierung, Stärke, Glucan Katabolismus
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

Tabelle A.13 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Y2H	ANAP	AraNet
AT1G56510 (WRR4)		Zelltod, Phosphorylierung, Abwehr, Proteinmodifikation, Membran, Kinase, Signalvermittler, Phosphotransferase, Rezeptoraktivität	Verschiedene
AT1G63180 (UGE3)		Chloroplast	Galaktose/ Lignin/ Hexose Metabolismus, Mikrosporogenese, Zellzyklus, Oxidoreduktase, UDP-Glycosyltransferase, Racemase/ Epimerase Aktivität, Trehalose Metabolismus
AT1G68440 (unknown)			Jasmonsäure, Ethylen, Salicylsäure, Gibberellin, ABA, Auxin, Transkription, Kälte
AT1G77690 (LAX3)			Amintransmembrantransporter
AT2G14660 (unknown)			Mitochondrieller Atmungskettenkomplex III, Oxidative Phosphorylierung, Oxidoreduktase
AT2G05540 (glycine-rich protein)			Verschiedene
AT2G15890 (MEE14)			Thylakoid
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

A. TABELLEN

Tabelle A.13 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Y2H	ANAP	AraNet
AT2G17880 (DNAJ)	Translation, Ribosom, mRNA Prozessierung, Hitzeschockprotein	Proteinfaltung, Hitzeschockprotein	Verschiedene
AT2G18050 (HIS1-3)			Chromosomenorganisation, Chromatinaufbau, DNA Konformationsänderung
AT3G15630 (unknown)		Disaccharid metabolischer Prozess	
AT3G23030 (IAA2)	Auxin, Transkription	Transkription, Auxin, Tropismus, Entwicklung, Nukleus	Auxin, Transkription
AT3G26740 (CCL)		Antwort auf Kälte, ABA	Kälte, Osmotischer Stress
AT3G29030 (EXP5)		Transporteraktivität	
AT3G47420 (G3P)			Zucker:Hydrogen Symporter, Phosphattransmembrantransporter
AT3G62950 (Glutaredoxin)			Disulfidoxidoreduktase, Elektronentransporter, NAD/NADH Bindung, Methyltransferase, Redox Homöostase, Alditol metabolischer Prozess, Myristoylierung, Lipidierung, Organophosphat
AT4G04630 (unknown)			Jasmonsäure, Ethylen, Salicylsäure, Gibberellin, ABA, Auxin, Transkription, Kälte
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

Tabelle A.13 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Y2H	ANAP	AraNet
AT4G17245 (Zinc finger)			Proteolyse, Ubiquitinierung
AT4G19380 (alcohol oxidase-related)			FAD-Bindung, Alkohol metabolischer Prozess, Endomembran, Carbon-Carbon-Lyase, Oxidoreduktase, Purinnukleosidbindung
AT4G28270 (Zinc finger)	Zink-Ion-Bindung, Ligase		
AT4G32280 (IAA29)		Transkription, Auxin	
AT4G39030 (EDS5)		Abwehrantwort, Antwort auf Stress, Jasmonsäure, Ethylen, Aromatische Komponenten biosynthetischer Prozess, Antwort auf Bakterium und Pilz, Carboxylsäure biosynthetischer Prozess, Salicylsäure	Tryptophan, Indolalkylamin, Chorismat Metabolismus, Antwort auf Bakterium, Anthranilatsynthase, Oxidoreduktase, Transferaseaktivität, Transport, Calcium-Ion Bindung, ER
AT5G02760 (PP2C)		Transkription, Auxin	Verschiedene
AT5G19120 (aspartic-type Endopeptidase)			Zuckerbindung, Zellwand
AT5G20250 (DIN10)	Chloroplast, Mitochondrium		Zellwand, Lactose/Galactosidase Aktivität
AT5G21170 (AKINBETA1)		Katabolischer Prozess	Verschiedene
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

A. TABELLEN

Tabelle A.13 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Locus	Y2H	ANAP	AraNet
AT5G22920 (Zinc finger)		Zellwand, Carbohy- drat metabolischer Prozess	Translationale Elongation, Ribo- som, Genexpression
AT5G24660 (LSU2)		Ribosom	
AT5G37770 (TCH2)			Transkription, Ant- wort auf Verwun- dung

Tabelle A.14: Regulatorische Elemente in den lateralen Modulen. - Fraktion der Gene in jedem Cluster, die eine Über- oder Unterrepräsentierung eines bestimmten Motives zeigen.

Motiv	K- mer Größe	Positiv/ negativ aktive Cluster	Fraktion in positiv aktiven Clustern	Fraktion in negativ aktiven Clustern
ACGCG	3	3, 4/ 11, 14	0,375; 0,514	0,196; 0,224
.GCAC.	4	1, 3, 6, 10/ 5, 11, 14	0,964; 0,906; 0,936; 0,896	0,688; 0,702; 0,709
[A C G]ACATG.	5	1, 3, 6/ 5, 11, 14	0,878; 0,894; 0,906	0,638; 0,644; 0,635
[A T]ATAATA.	6	0, 1, 3, 6, 10/ 5, 11, 14	0,893; 0,856; 0,888; 0,854; 0,866	0,592; 0,564; 0,631
.A[A C]CGCG[G T]	6	3, 4/ 11, 12	0,205; 0,314	0,058; 0,040
[A C T][A C]GGCCCA	6	14/ 6, 10	0,358	0,169; 0,104
.AATAATA.	7	0, 1, 3, 6, 10/ 5, 11, 14	0,786; 0,777; 0,764; 0,727; 0,751	0,447; 0,475; 0,486
[C G T]C[C T]TATCC.	7	0, 3, 6, 10/ 14	0,583; 0,228; 0,243; 0,264	0,080
[A C T]CACG[G T]C[A T][C G T]	7	0, 10/ 5, 14	0,321; 0,269	0,085; 0,095
[A G T]AA[A G]CCCTA	7	5, 14/ 7	0,298; 0,323	0,092
[A C T][A C]GGCCCA[A G T]	7	14/ 6, 10	0,340	0,139; 0,090
.[A T][A C G]CGCGT.	7	3, 4, 8/ 11, 12, 14	0,260; 0,400; 0,219	0,070; 0,085; 0,113
Fortsetzung auf der nächsten Seite				

Tabelle A.14 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Motiv	K- mer Größe	Positiv/ negativ aktive Cluster	Fraktion in positiv aktiven Clustern	Fraktion in negativ aktiven Clustern
[A C T]ACAGCTG.	7	3/ 7, 11	0,127	0,031; 0,027
GT[A G]GG[C G T][G T]C[A C T]	7	0, 6/ 14	0,214; 0,184	0,050
[A G T]AA[A G]CCCTA[A C G]	8	5, 14/ 7, 9	0,266; 0,302	0,081; 0,090
.AATAATAA.	8	3, 10/ 5, 11, 14	0,508; 0,507	0,248; 0,269; 0,269
.CTTATC[C T][A G T].	8	0, 2, 6, 10/ 5, 14	0,714; 0,422; 0,476; 0,498	0,230; 0,202
[A G T][A C]CACGT.[G T][A G T]	8	10, 13/ 5, 11, 14	0,403; 0,417	0,191; 0,184; 0,160
[A G T][A C][C G]CATGTG.	8	6, 10/ 11, 14	0,228; 0,179	0,061; 0,045
[A T]TGGATAA[A C].	8	0, 10/ 14	0,298; 0,184	0,063
[A C T].[A T][A C G]CGCGT.	8	3, 4/ 11, 12, 14	0,248; 0,376	0,056; 0,065; 0,093
.A[A T]GTTGAC.	8	3, 4, 9/ 5, 14	0,184; 0,210; 0,180	0,035; 0,071
.[C T][A G]C[A C G]G[A T]CA.	8	1, 12/ 5, 11, 14	0,468; 0,431	0,216; 0,203; 0,232
[A G T]C[C G]C[A G]C[A G]CA- [C G T]	8	0, 8/ 7	0,143; 0,079	0,011
[C G T]A[A T]ACGATC[A C T]	8	4, 6/ 8, 11	0,076; 0,071	0,002; 0,010
.ACATC[A G T]AC[A C T]	8	3, 6/ 11	0,163; 0,180	0,044
.C[A C]AATCTA.	8	0, 3/ 5, 14	0,286; 0,239	0,085; 0,104

A. TABELLEN

Tabelle A.15: Differenziell exprimierte Transkriptionsfaktoren in den lateralen Modulen. - Die hier aufgelisteten Transkriptionsfaktoren sind Vertreter von Transkriptionsfamilien, die möglicherweise an den identifizierten regulatorischen Elementen binden.

Mutmaßlich gebundenes Motiv	Locus	Kurzname
ABREATRD22	AT1G13450	GT-1
	AT1G69010	BIM2
ATMYC2-RD22	AT1G69010	BIM2
ABRE-like	AT4G01120	GBF2
	AT2G46270	GBF3
	AT1G03970	GBF4
	AT4G34590	GBF6
WBOXATNPR1	AT2G03340	WRKY3
	AT4G31800	WRKY18
	AT5G07100	WRKY26
	AT4G30935	WRKY32
	AT2G38470	WRKY33
	AT3G04670	WRKY39
	AT1G80840	WRKY40
	AT3G01970	WRKY45
	AT2G46400	WRKY46
	AT4G23810	WRKY53
	AT3G56400	WRKY70
HEXAT	AT5G65210	TGA1

Tabelle A.16: Pfade, die durch KEGG Spider, R Spider und PPI Spider in den lateralen Modulen als signifikant befunden wurden. - Pfade mit einem P-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet und entsprechend ihrer Ähnlichkeit in Kategorien unterteilt.

KEGG Spider		R Spider		PPI Spider	
P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)
< 0,005	Valine, Leucine and Isoleucine biosynthesis (Aminosäuremetabolismus)	0,01	Flavone and Flavonol biosynthesis (Pigmente)	< 0,005	Flavonoid biosynthetic process (Pigmente)
	Glycine, Serine and Threonine metabolism (Aminosäuremetabolismus)		Flavonol biosynthetic process (Pigmente)		Red light signaling pathway (Licht)
	Arginine and Proline metabolism (Aminosäuremetabolismus)		Flavonoid biosynthesis (Pigmente)		Abscisic acid mediated signaling pathway (Hormone)
	Aminoacyl-tRNA biosynthesis (Translation)		Sulfate assimilation (Schwefel)		Response to water deprivation (Wassermangel)
	Nitrogen metabolism (Aminosäuremetabolismus)		Starch catabolic process (Zucker)		Potassium ion transport (Ione)
< 0,025	Tryptophan metabolism (Aminosäuremetabolismus)		Anthocyanin biosynthetic process (Pigmente)		Detection of Calcium ion (Ione)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A. TABELLEN

Tabelle A.16 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

KEGG Spider		R Spider		PPI Spider	
P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)
	Arginine and Proline metabolism (Aminosäuremetabolismus)		Amylopectin biosynthetic process (Fettsäuremetabolismus, Zellwand)		Regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle (Wachstum)
	Alpha-Linolenic-acid metabolism (Fettsäuremetabolismus, Zellwand)		Aminoacyl-tRNA biosynthesis (Translation)		Hormone mediated signaling pathway (Hormone)
	Phenylalanine metabolism (Aminosäuremetabolismus)		Porphyrin and Chlorophyll metabolism (Pigmente)		RNA processing (Transkription)
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids (Fettsäuremetabolismus, Zellwand)		Chloroplast organization (Chloroplast)	< 0,04	Hormone mediated signaling pathway (Hormone)
	Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan biosynthesis (Aminosäuremetabolismus)		Histone phosphorylation (Transkription)	< 0,03	Ubiquitin dependent protein catabolic process (Proteinmodifikation)
	Valine, Leucine and Isoleucine degradation (Aminosäuremetabolismus)		Translation (Translation)		Response to Abscisic acid (Hormone)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.16 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

KEGG Spider		R Spider		PPI Spider	
P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)
	Glutathione metabolism (Redox, ROS)		Ribosome biogenesis (Transkription)	< 0,02	Ubiquitin dependent protein catabolic process (Proteinmodifikation)
	Valine, Leucine and Isoleucine biosynthesis (Aminosäuremetabolismus)		Purine nucleotide biosynthetic process (Transkription)		Flavonoid biosynthetic process (Pigmente)
	Aminoacyl-tRNA biosynthesis (Translation)		rRNA processing (Transkription)		Red light signaling pathway (Licht)
	Cysteine and Methionine metabolism (Aminosäuremetabolismus)	0,015	Polyamine biosynthetic process (Translation)		Response to blue light (Licht)
0,025	Flavone and Flavonol biosynthesis (Pigmente)		Response to Fructose stimulus (Zucker)		Xylem and phloem pattern formation (Wachstum)
			Response to absence of light (Licht)		Defense response to bacterium (Abwehrreaktion)
			Lipid transport (Fettsäuremetabolismus, Zellwand)	< 0,01	Response to UV-B (Licht)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A. TABELLEN

Tabelle A.16 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

KEGG Spider		R Spider		PPI Spider	
P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)	P-Wert	Pfad (Kategorie)
			Glucosinolate biosynthetic process (Zucker)		
			Alpha-Linolenic-acid metabolism (Fettsäurenmetabolismus, Zellwand)		
			Flavonoid biosynthetic process (Pigmente)		
		0,035	Response to Glucose stimulus (Zucker)		
		0,045	Jasmonic acid biosynthetic process (Hormone)		
			Autophagy (Apoptose)		
			Trehalose biosynthetic process (Zucker)		
			Chloroplast fission (Chloroplast)		
			Protein import into chloroplast stroma (Chloroplast)		
			Photosynthetic electron transport chain (Redox, ROS)		

Tabelle A.17: miRNAs, die mit dem Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten sowie den lateralen Modulgenen und ihren direkten Interaktionspartnern verknüpft sind. - Ihre Einordnung bezieht sich auf ihre Sequenzähnlichkeit und der Sequenz der unreifen miRNAs [Griffiths-Jones, 2003].

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR159a	ath-miR835-3p	ath-miR407
ath-miR164a	ath-miR837-3p	ath-miR414
ath-miR164b	ath-miR863-3p	ath-miR415
ath-miR164c	ath-miR863-5p	ath-miR419
ath-miR167a	ath-miR865-5p	ath-miR773
ath-miR167b	ath-miR5024-3p	ath-miR778
ath-miR167d		ath-miR783
ath-miR169d		ath-miR829
ath-miR169e		ath-miR830
ath-miR169f		ath-miR844
ath-miR169g		ath-miR858
ath-miR172a		ath-miR1886
ath-miR172b		ath-miR2937
ath-miR172c		ath-miR5633
ath-miR172d		ath-miR5637
ath-miR172e		ath-miR5641
ath-miR393a		ath-miR5652
ath-miR393b		ath-miR5655
ath-miR395a		ath-miR5658
ath-miR395b		
ath-miR395c		
ath-miR395d		
ath-miR395e		
ath-miR395f		
ath-miR2111a		
ath-miR2111b		
ath-miR5015b		
ath-miR5630a		
ath-miR5630b		

A. TABELLEN

Tabelle A.18: Am Subnetzwerk, basierend auf EXCERBT sowie den Genen der lateralen Module und ihren jeweils direkten Interaktionspartnern, beteiligte miRNAs. - Ihre Einordnung bezieht sich auf ihre Sequenzähnlichkeit und der Sequenz der unreifen miRNAs [Griffiths-Jones, 2003].

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR156a	ath-miR833-5p	ath-miR161
ath-miR156b	ath-miR837-3p	ath-miR418
ath-miR156c	ath-miR863-3p	ath-miR426
ath-miR156d	ath-miR863-5p	ath-miR472
ath-miR156e	ath-miR864-5p	ath-miR775
ath-miR156f	ath-miR865-3p	ath-miR776
ath-miR156g	ath-miR2934-5p	ath-miR778
ath-miR156h	ath-miR3440b-5p	ath-miR823
ath-miR156i	ath-miR5024-3p	ath-miR826
ath-miR156j	ath-miR5648-5p	ath-miR827
ath-miR157a		ath-miR830
ath-miR157b		ath-miR831
ath-miR157c		ath-miR838
ath-miR157d		ath-miR847
ath-miR159a		ath-miR852
ath-miR159b		ath-miR858
ath-miR159c		ath-miR869
ath-miR162a		ath-miR1886
ath-miR162b		ath-miR3434
ath-miR164a		ath-miR4221
ath-miR164b		ath-miR5021
ath-miR164c		ath-miR5022
ath-miR165a		ath-miR5029
ath-miR165b		ath-miR5628
ath-miR166a		ath-miR5633
ath-miR166b		ath-miR5637
ath-miR166c		ath-miR5641
ath-miR166d		ath-miR5650
ath-miR166e		ath-miR5653
ath-miR166f		ath-miR5656
ath-miR166g		ath-miR5658
ath-miR167c		ath-miR5664
ath-miR168a		
ath-miR168b		
ath-miR172a		
ath-miR172b		

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.18 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Sequenzähnlich	Gleicher Vorläufer	Verschiedene Sequenzen
ath-miR172c		
ath-miR172d		
ath-miR172e		
ath-miR319c		
ath-miR393a		
ath-miR393b		
ath-miR396a		
ath-miR396b		
ath-miR397b		
ath-miR773b		
ath-miR781		
ath-miR781b		
ath-miR854a		
ath-miR854b		
ath-miR854c		
ath-miR854d		
ath-miR854e		
ath-miR858b		
ath-miR5015b		
ath-miR5020a		
ath-miR5635a		
ath-miR5635b		
ath-miR5635c		
ath-miR5635d		

Tabelle A.19: Vergleich der Kategorien, die durch GO-Anreicherungsanalyse der einzelnen Gruppen in den Subnetzwerken aufbauend auf dem Y2H Datenset und EXCERBT festgelegt wurden. - Die einzelnen Kategorien wurden zu Grunde liegenden biologischen Prozessen zugeordnet. Die Kategorie *Verschiedene*, welche beim Subnetzwerk basierend auf EXCERBT auftritt (vgl. Tabelle C25), wurde für diese Auswertung nicht herangezogen.

Prozess	Unterkategorie	Y2H	EXCERBT
Translation	Translation	x	
Transkription	Transkription	x	x
	Transkriptionsregulation	x	
	Nukleinsäurebindung	x	
	Genexpression		x
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

A. TABELLEN

Tabelle A.19 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Prozess	Unterkategorie	Y2H	EXCERBT
	Helikase		x
	Nukleus	x	x
Auxin	Auxin	x	
	Antwort auf Auxin, Auxin-transport		x
Phosphorylierung	Phosphorylierung	x	x
	Phosphotransferase		x
	Pyrophosphatase		x
Wassermangel	Wassermangel	x	
	Wasserkanal	x	
	Antwort auf Wassermangel		x
Wachstum	Wachstum	x	x
	Vernalisierungsantwort		x
	Zellzyklus		x
	Gravitropismus		x
	Meristemerhaltung		x
Entwicklung	Entwicklung	x	x
	Reproduktion		x
	Blütenentwicklung		x
	Stomatamorphogenese		x
	Photomorphogenese		x
Zirkadianer Rhythmus	Cytokinin	x	x
	Zirkadianer Rhythmus		x
Stress	Osmotischer Stress	x	
	Antwort auf Stress	x	
	Stress		x
	ABA		x
Proteinmodifikation	Proteinmodifikation	x	x
	Hitzeschockproteinbindung	x	
	Ubiquitin-abhängiger Katabolismus		x
Abwehrreaktion	Immunantwort	x	x
	Jasmonsäure	x	x
	Salicylsäure	x	
	Zelltod		x
	Abwehr		x
	Autophagie	x	
	Toxinmetabolismus	x	
	Glutathiontransferase	x	
Camalexin		x	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.19 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Prozess	Unterkategorie	Y2H	EXCERBT
	Antwort auf Verwundung		x
Licht	Antwort auf dunkelrotes Licht	x	
	Antwort auf Licht	x	x
	Flavonoidsynthese		x
Chloroplast	Chloroplast	x	x
	Photosynthese		x
Zucker	Carbohydratbindung	x	
	Carbohydratmetabolismus		x
	Hexosylgruppentransfer		x
	Antwort auf Hexose		x
Signalgebung	Zellkommunikation	x	
	Signalgebung		x
	MAP Kinase Kinase		x
	Phosphorelay		x
Zellwand	Zellwand	x	x
	Zellulosesynthese		x
	Zellwandbiogenese		x
Gene Silencing	Gene Silencing durch RNA		x
Ionenbindung	Calciumbindung	x	
	Ionenbindung	x	x
Redox	Oxidoreduktase		x
Metabolismus	Metabolischer Prozess	x	
	Negative Regulierung zellulärer metabolischer Prozesse	x	
Hydrolase	Hydrolaseaktivität	x	
	Hydrolase		x
Steroide	Brassinosteroid		x
	Steroid	x	
Mitochondrium	Mitochondrium		x
	Zelluläre Respiration		x
Ethylen	Ethylen		x
Transport	Heilmitteltransport	x	
	Transport	x	x
	Kation-Transmembrantransport		x
	Ionentransport		x
	Proteinlokalisierung		x
Sonstige	Cytosol	x	
	Homöostase	x	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A. TABELLEN

Tabelle A.19 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

Prozess	Unterkategorie	Y2H	EXCERBT
	Intrazelluläres nicht-membranumgebenes Organell	x	
	Zellkortex	x	
	Transaminase		x
	DNA-Methylierung		x
	Phospholipidbindung		x
	Stickstoffkomponentensynthese		x
	Calmodulinbindung		x
	Schwefelmetabolismus		x
	DNA-Reperatur		x
	Alkoholmetabolismus		x
	Golgi Apparat		x
	Stomatabewegung		x
	GTP-Bindung	x	
	Regulation hormoneller Level	x	
	Verschiedene	x	

Tabelle A.20: Zielgene der in den Netzwerken basierend auf den lateralen Modulen vorkommenden miRNAs. - Die Zielgene sowie ihre Kurzbeschreibung der in allen Netzwerken basierend auf den lateralen Modulen sowie Y2H und EXCERBT vorkommenden miRNAs.

miRNA	Zielgen	Kurzbeschreibung (TAIR9)	Netzwerk
ath-miR159a	AT2G46890	oxidoreductase, acting on the CH-CH group of donors	Y2H
	AT3G60460	DUO1 (DUO POLLEN 1)	EXCERBT
ath-miR161	AT2G41720	EMB2654 (EMBRYO DEFECTIVE 2654)	Y2H
	AT5G64630	FAS2 (FASCIATA 2)	EXCERBT
ath-miR164a	AT1G10530	unknown protein	Y2H
	AT5G53950	CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON 2)	EXCERBT
	AT1G56010	NAC1	
	AT3G15170	CUC1 (CUP-SHAPED COTYLEDON1)	
ath-miR164b	AT1G10530	unknown protein	Y2H
	AT1G56010	NAC1	EXCERBT

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle A.20 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

miRNA	Zielgen	Kurzbeschreibung (TAIR9)	Netzwerk
	AT3G15170	CUC1 (CUP-SHAPED COTYLEDON1)	EXCERBT
ath-miR164c	AT1G10530	unknown protein	Y2H
	AT5G53950	CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON 2)	EXCERBT
	AT1G56010 AT3G15170	NAC1 CUC1 (CUP-SHAPED COTYLEDON1)	
ath-miR172a	AT2G39250 AT5G60120	SNZ (SCHNARCHZAPFEN) TOE2	Y2H
	AT4G36920 AT3G54990	AP2 (APETALA 2) SMZ (SCHLAFMÜTZE)	EXCERBT
ath-miR172b	AT2G39250 AT5G60120	SNZ (SCHNARCHZAPFEN) TOE2	Y2H
	AT4G36920 AT3G54990	AP2 (APETALA 2) SMZ (SCHLAFMÜTZE)	EXCERBT
ath-miR172c	AT2G39250 AT5G60120	SNZ (SCHNARCHZAPFEN) TOE2	Y2H
	AT4G36920 AT3G54990	AP2 (APETALA 2) SMZ (SCHLAFMÜTZE)	EXCERBT
ath-miR172d	AT2G39250 AT5G60120	SNZ (SCHNARCHZAPFEN) TOE2	Y2H
	AT3G54990 AT4G36920	SMZ (SCHLAFMÜTZE) AP2	EXCERBT
ath-miR172e	AT2G39250 AT5G60120	SNZ (SCHNARCHZAPFEN) TOE2	Y2H
	AT3G54990 AT4G36920	SMZ (SCHLAFMÜTZE) AP2 (APETALA 2)	EXCERBT
ath-miR393a	AT3G26810	AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2)	Y2H
	AT2G38470 AT3G26810	WRKY33 AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2)	EXCERBT
	AT4G03190	GRH1 (GRR1-LIKE PROTEIN 1)	
ath-miR393b	AT3G26810	AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2)	Y2H
	AT2G38470 AT3G26810	WRKY33 AFB2 (AUXIN SIGNALING F-BOX 2)	EXCERBT

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A. TABELLEN

Tabelle A.20 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

miRNA	Zielgen	Kurzbeschreibung (TAIR9)	Netzwerk
	AT4G03190	GRH1 (GRR1-LIKE PROTEIN 1)	
ath-miR778	AT2G03220	FT1 (FUCOSYLTRANSFERASE 1)	Y2H
	AT5G48560	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	
	AT2G35160	SUVH5 (SU(VAR)3-9 HOMOLOG 5)	EXCERBT
ath-miR830	AT4G02150	MOS6 (MODIFIER OF SNC1, 6)	Y2H
	AT4G35230	BSK1 (BR-SIGNALING KINASE 1)	EXCERBT
ath-miR837-3p	AT1G30135	JAZ8 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8)	Y2H
	AT3G06483	PDK (PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE)	EXCERBT
ath-miR858	AT4G09460	ATMYB6	Y2H
	AT2G47460	MYB12 (MYB DOMAIN PROTEIN 12)	EXCERBT
	AT3G24310	MYB305 (myb domain protein 305)	
	AT5G35550	TT2 (TRANSPARENT TESTA 2)	
ath-miR863-3p	AT1G01240	unknown protein	Y2H
	AT2G29980	FAD3 (FATTY ACID DESATURASE 3); omega-3 fatty acid desaturase	
	AT5G14750	ATMYB66 (MYB DOMAIN PROTEIN 66)	EXCERBT
ath-miR863-5p	AT1G54170	CID3 (CTC-Interacting Domain 3)	Y2H
	AT1G74840	myb family transcription factor	
	AT5G42240	scpl42 (serine carboxypeptidase-like 42)	
	AT5G46280	DNA replication licensing factor, putative	EXCERBT
ath-miR1886	AT5G13180	ANAC083 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 83)	Y2H
Fortsetzung auf der nächsten Seite			

Tabelle A.20 – Fortsetzung von der vorherigen Seite

miRNA	Zielgen	Kurzbeschreibung (TAIR9)	Netzwerk
	AT4G08230	glycine-rich protein	
	AT3G44200	NEK6 (NIMA (NEVER IN MITOSIS, GENE A)-RELATED 6")	EXCERBT
ath-miR5015b	AT1G12860	SCRM2 (SCREAM 2)	Y2H
	AT3G20770	EIN3 (ETHYLENE-INSENSITIVE3)	EXCERBT
	AT1G12860	SCRM2 (SCREAM 2)	
	AT4G36260	STY2 (STYLISH 2)	
ath-miR5024-3p	AT1G15750	TPL (TOPLESS)	Y2H
	AT3G13290	VCR (VARICOSE-RELATED)	EXCERBT
ath-miR5641	AT5G04600	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	Y2H
	AT4G23750	CRF2 (CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2)	EXCERBT
ath-miR5633	AT4G10160	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	Y2H
	AT4G00450	CRP (CRYPTIC PRECOCIUS)	EXCERBT
ath-miR5637	AT2G44950	HUB1 (HISTONE MONO-UBIQUITINATION 1)	Y2H
	AT2G44950	HUB1 (HISTONE MONO-UBIQUITINATION 1)	EXCERBT
ath-miR5658	AT1G73500	MKK9 (MAP KINASE KINASE 9)	Y2H
	AT1G73500	MKK9 (MAP KINASE KINASE 9)	EXCERBT

A. TABELLEN

Anhang B

Abbildungen

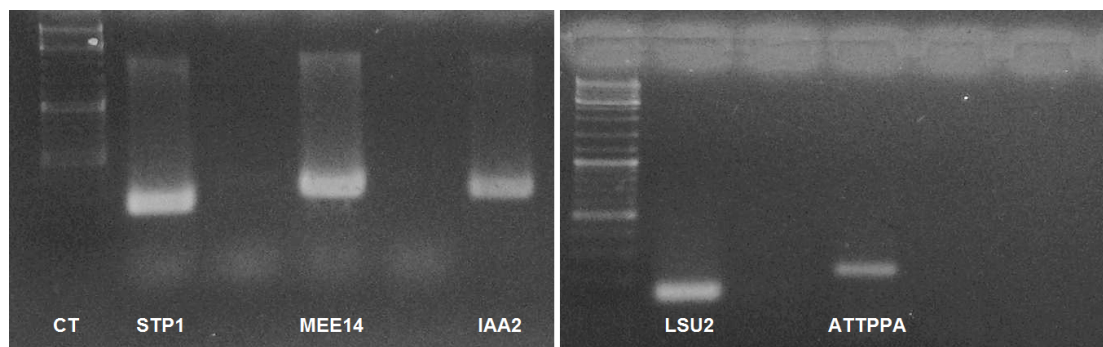


Abbildung B.1: Amplifizierte RNA Transkripte der Gene STP1 (AT1G11260), MEE14 (AT2G15890), IAA2 (AT3G23030), LSU2 (AT5G24660) und ATTPPA (AT5G51460) im Rahmen der qPCR-Analyse, durchgeführt von Dr. Lars Dietzel. - Die Transkripte der qPCR wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Banden zeigen die erfolgreiche Amplifikation der Transkripte der jeweiligen Gene.

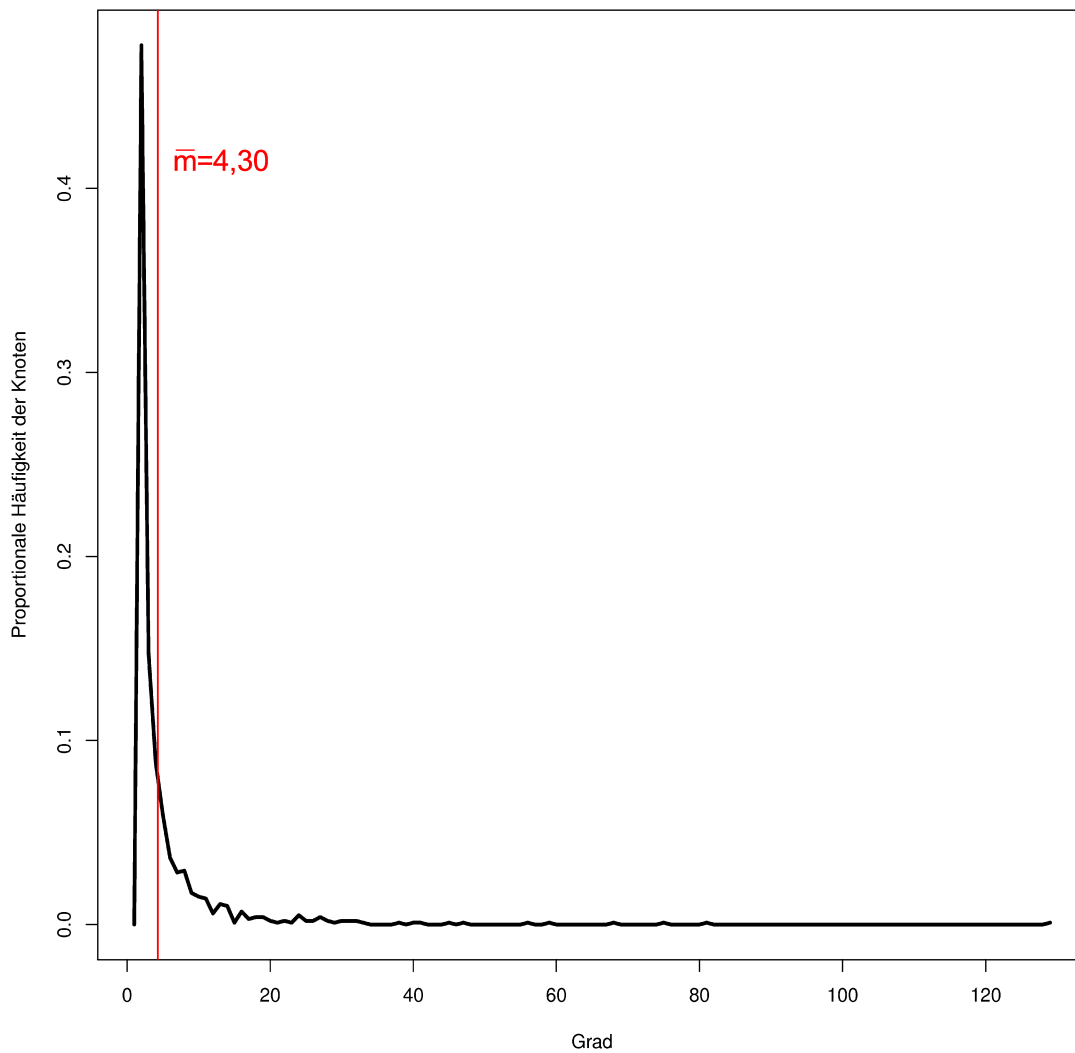


Abbildung B.2: Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten und den Grundmodulgenen. - Das Subnetzwerk baut auf dem Y2H-Datensatz [Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011] und den Grundmodulgenen mit ihren direkten und indirekten Interaktionspartnern auf. Der mittlere Verknüpfungsgrad \bar{m} der Knoten des Netzwerkes ist durch einen roten Balken dargestellt.

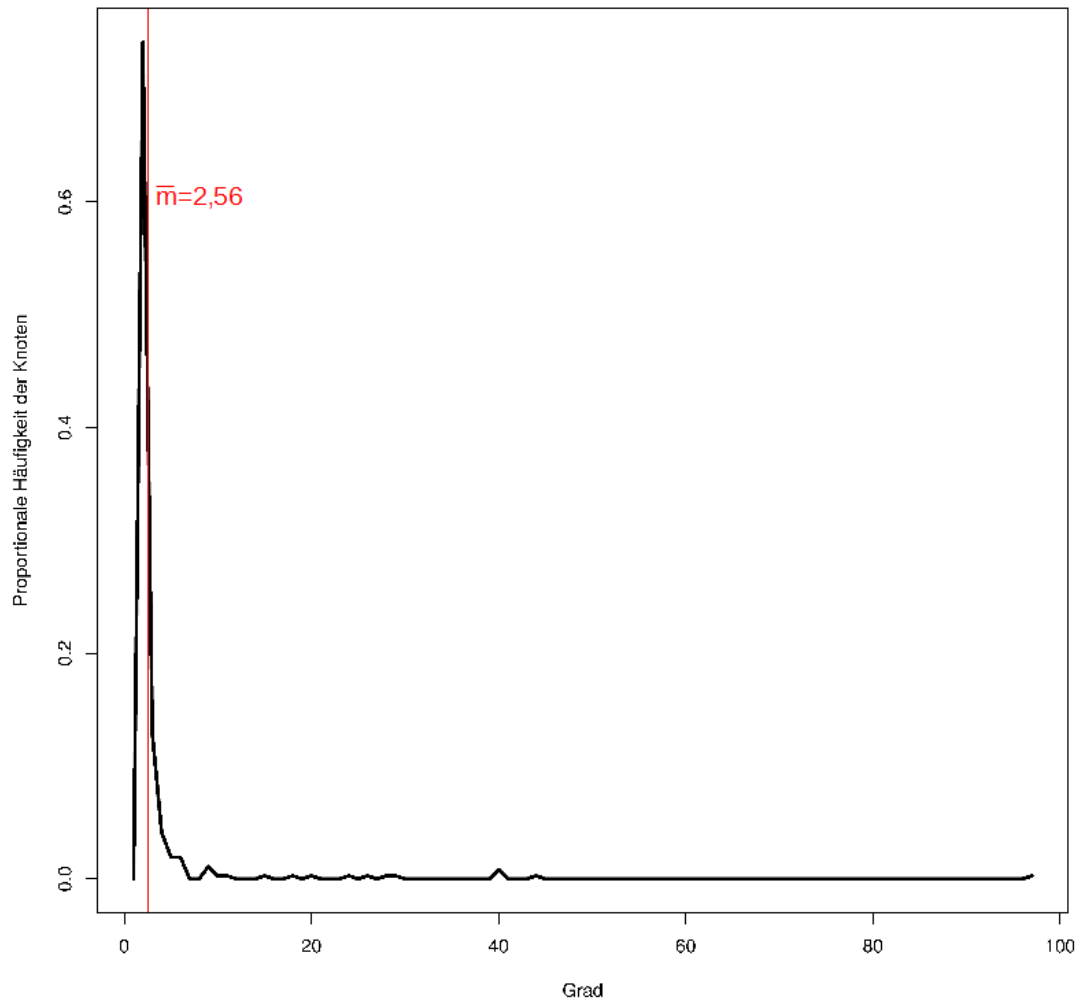


Abbildung B.3: Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf ANAP und den Grundmodulgenen. - Das Subnetzwerk baut auf ANAP [Wang et al., 2012] und den Grundmodulgenen mit ihren direkten Interaktionspartnern auf. Der mittlere Verknüpfungsgrad \bar{m} der Knoten des Netzwerkes ist durch einen roten Balken dargestellt.

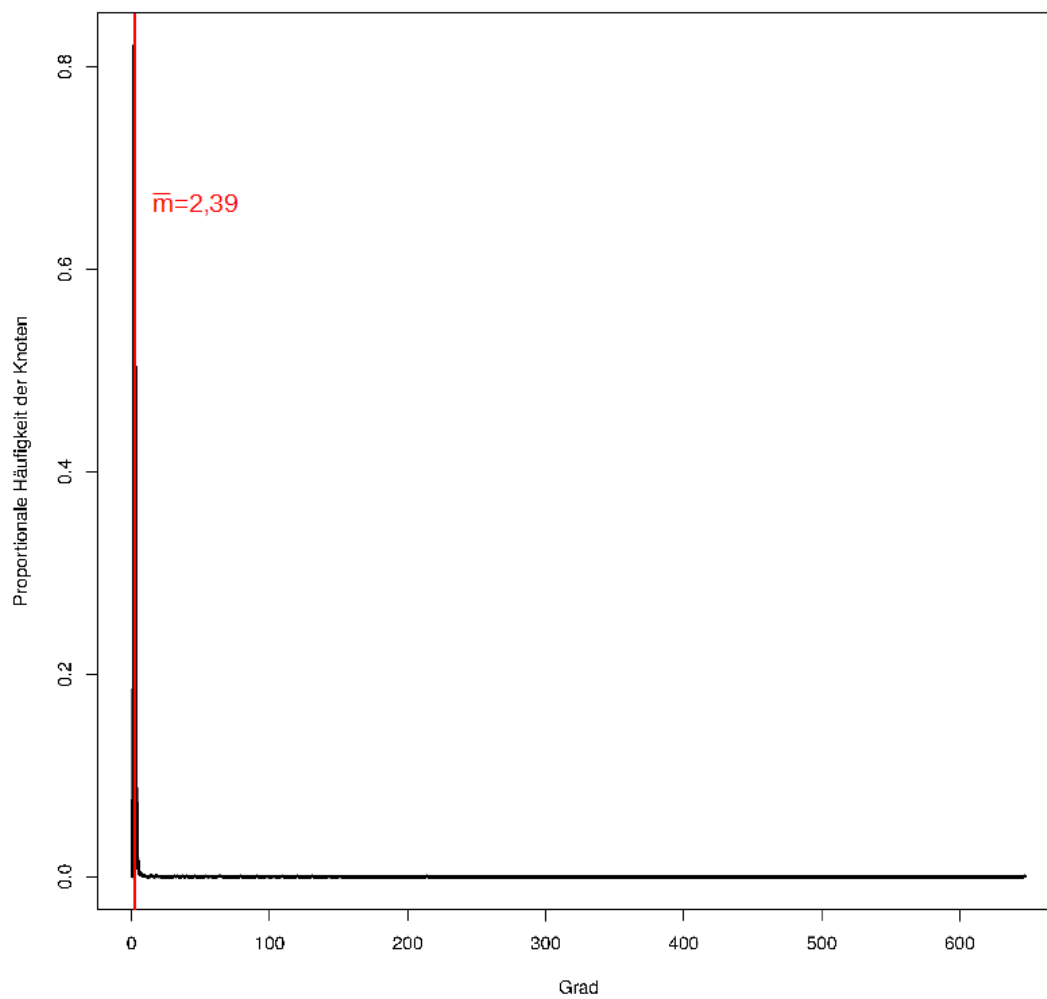


Abbildung B.4: Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf AraNet und den Grundmodulgenen. - Das Subnetzwerk baut auf AraNet [Wang et al., 2012] und den Grundmodulgenen mit ihren direkten Interaktionspartnern auf. Der mittlere Verknüpfungsgrad \bar{m} der Knoten des Netzwerkes ist durch einen roten Balken dargestellt.

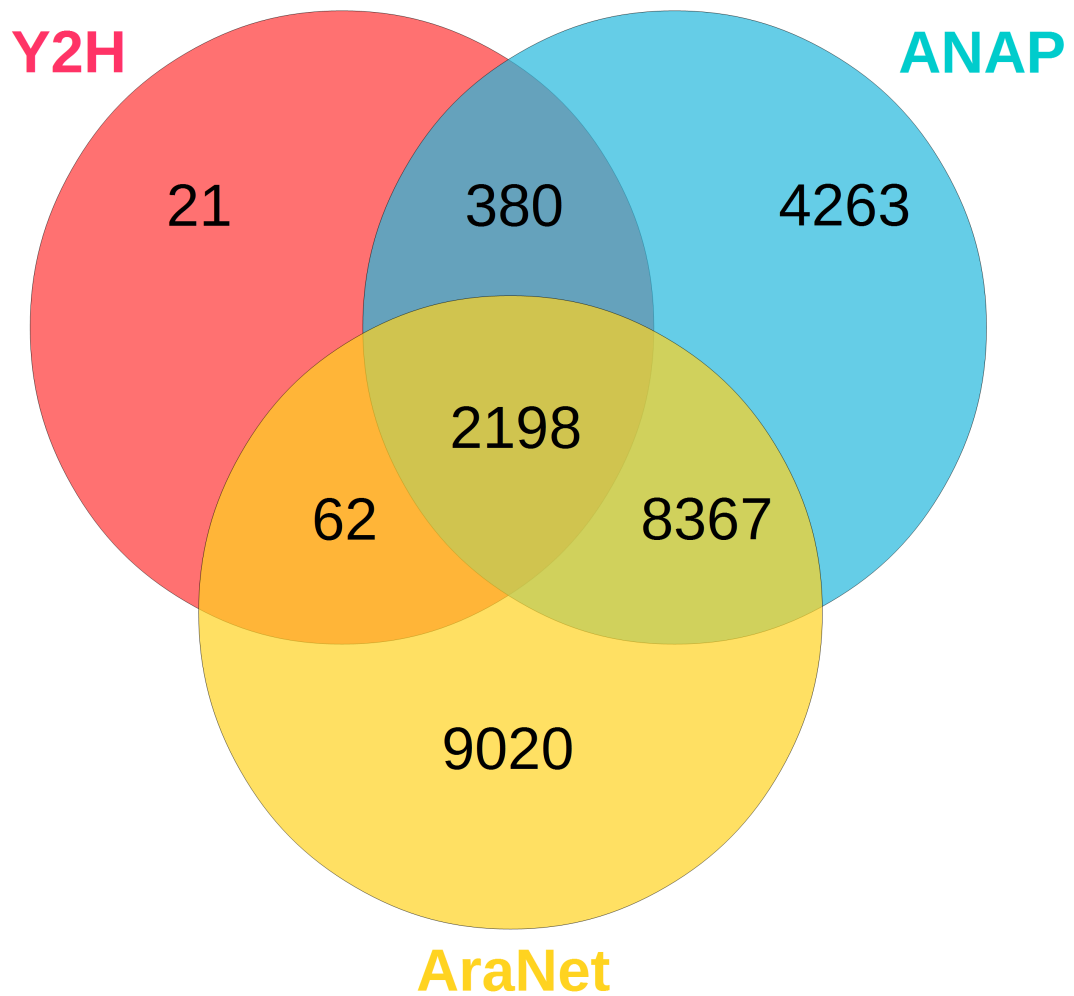


Abbildung B.5: Gemeinsame Interaktoren der Subnetzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom, ANAP und AraNet. - Die Überschneidung der Interaktoren der Subnetzwerke basierend auf dem Y2H-Interaktom, ANAP und AraNet, zeigt eine Schnittmenge von 2198 Proteinen.

B. ABBILDUNGEN

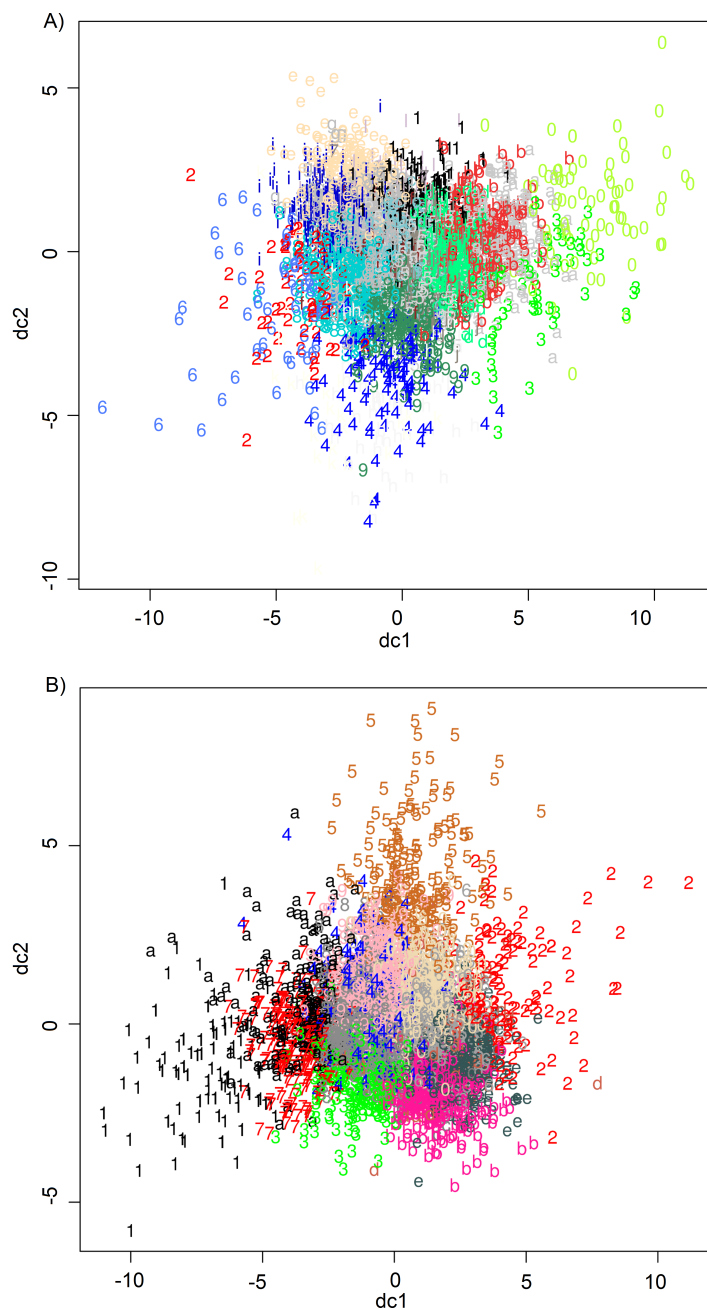


Abbildung B.6: Darstellung der Auftrennung der Cluster, welche mit dem *kmeans*-Algorithmus berechnet wurden, anhand der ersten ($dc1$) und zweiten ($dc2$) Diskriminantenkoordinate [Crimin et al., 2007]. - Die Auftrennung von Clustern anhand der Diskriminantenkoordinaten ist ähnlich einer *Principal Component Analysis (PCA)* und zeigt die Hauptvariationsrichtungen eines Datensets an [Crimin et al., 2007]. A) Nach dem Scree-Test-ähnlichen Verfahren sind die Gene, welche in mindestens drei Experimenten differenziell exprimiert sind, in 22 Cluster einzuteilen. Die Cluster sind jedoch stark interferent. B) Eine bessere Auftrennung der Cluster wird bei 15 Clustern erreicht.

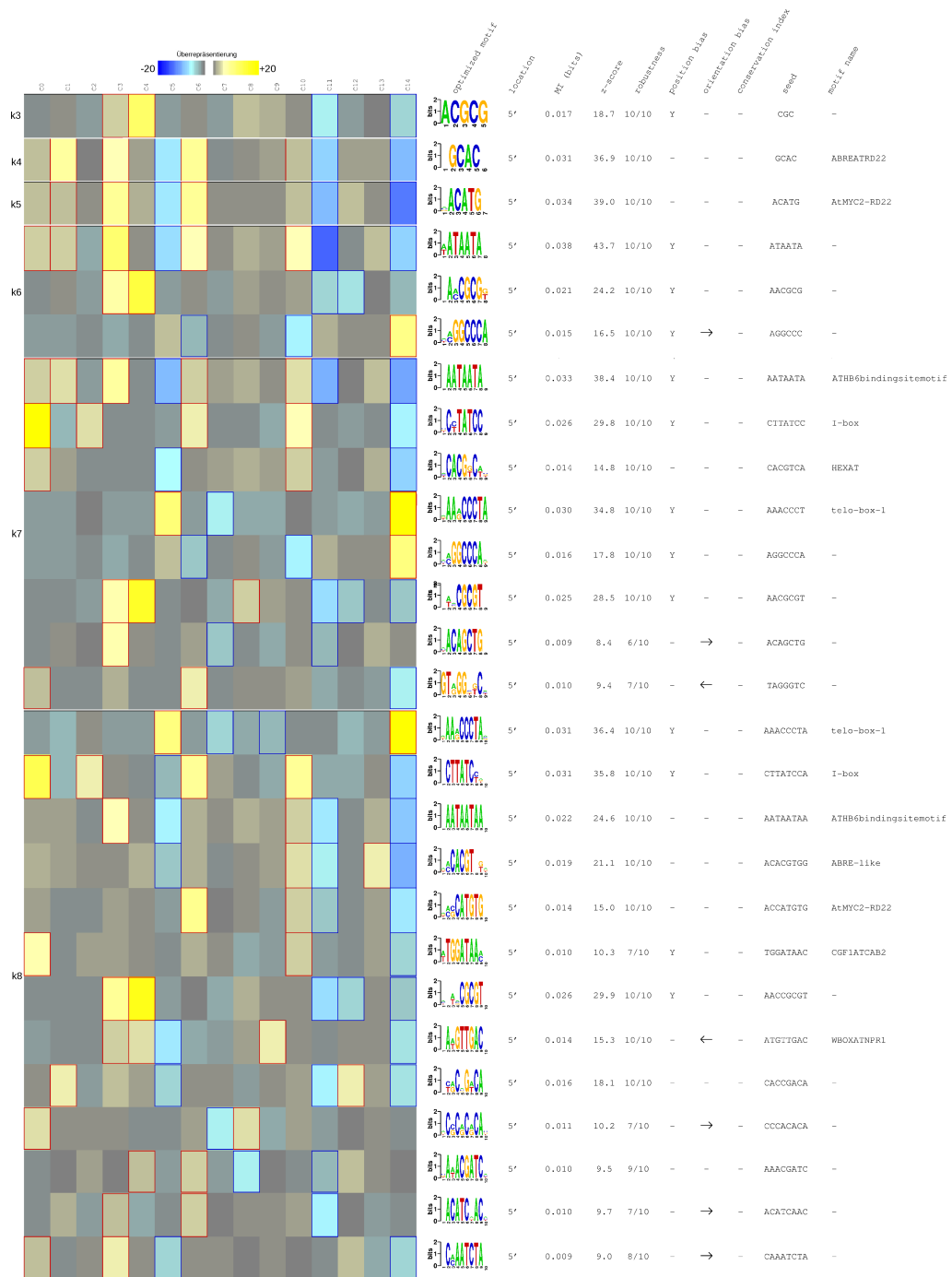


Abbildung B.7: Darstellung der FIRE Ergebnisse für die Gene der lateralen Module. - Für jeden Cluster (benannt als C0 bis C14) wurden Motive mit K-mer Größen von 3 bis 8 gesucht (links). Die Motive sind entweder in gelb (Überrepräsentierung) oder in blau (Unterrepräsentierung) markiert. Die Sequenz sowie der Name jedes Motivs sind rechts dargestellt. Um die Information, welcher Cluster ein bestimmtes Motiv bei verschiedenen K-mer-Größen zeigt, zu wahren, sind die Ergebnisse aller K-merer hier dargestellt.

B. ABBILDUNGEN

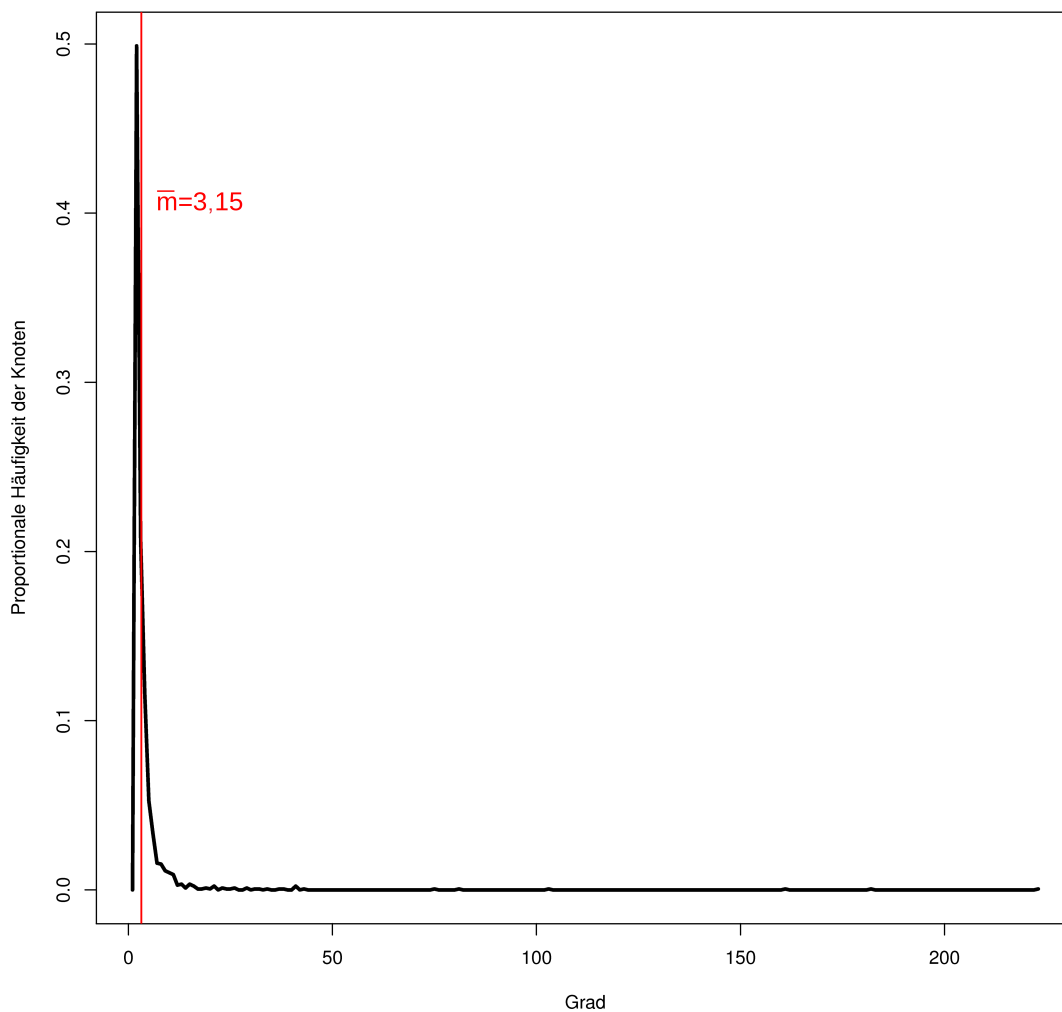


Abbildung B.8: Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf Y2H-Daten und den Genen der lateralen Module. - Das Subnetzwerk baut auf Y2H-Daten und den Genen der lateralen Module sowie deren direkten Interaktionspartner auf. Der mittlere Verknüpfungsgrad \bar{m} der Knoten des Netzwerkes ist durch einen roten Balken dargestellt.

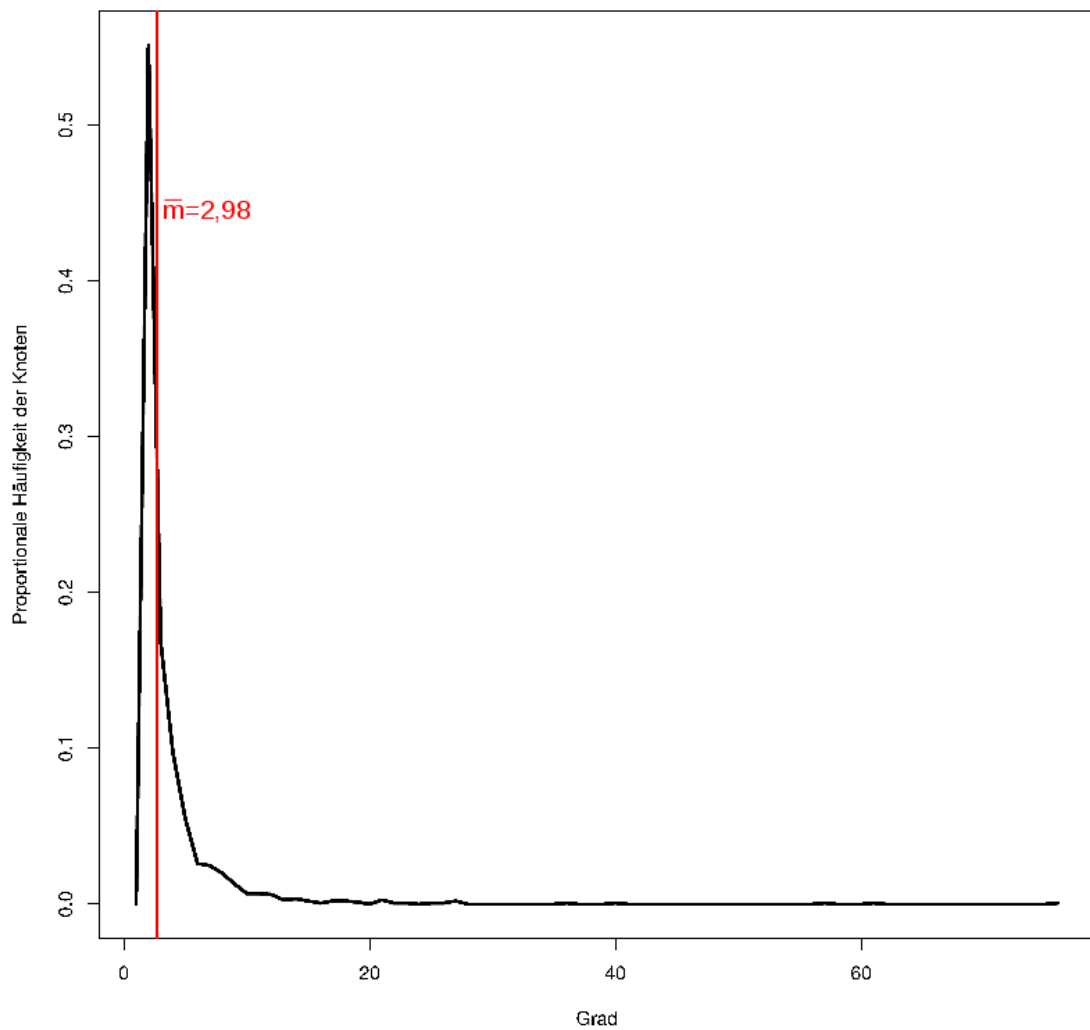


Abbildung B.9: Darstellung der Gradverteilung und Häufigkeit der Knoten beim Subnetzwerk basierend auf EXCERBT und den Genen der lateralen Module. - Das Subnetzwerk baut auf EXCERBT und den Genen der lateralen Module sowie deren direkten Interaktionspartner auf. Der mittlere Verknüpfungsgrad \bar{m} der Knoten des Netzwerkes ist durch einen roten Balken dargestellt.

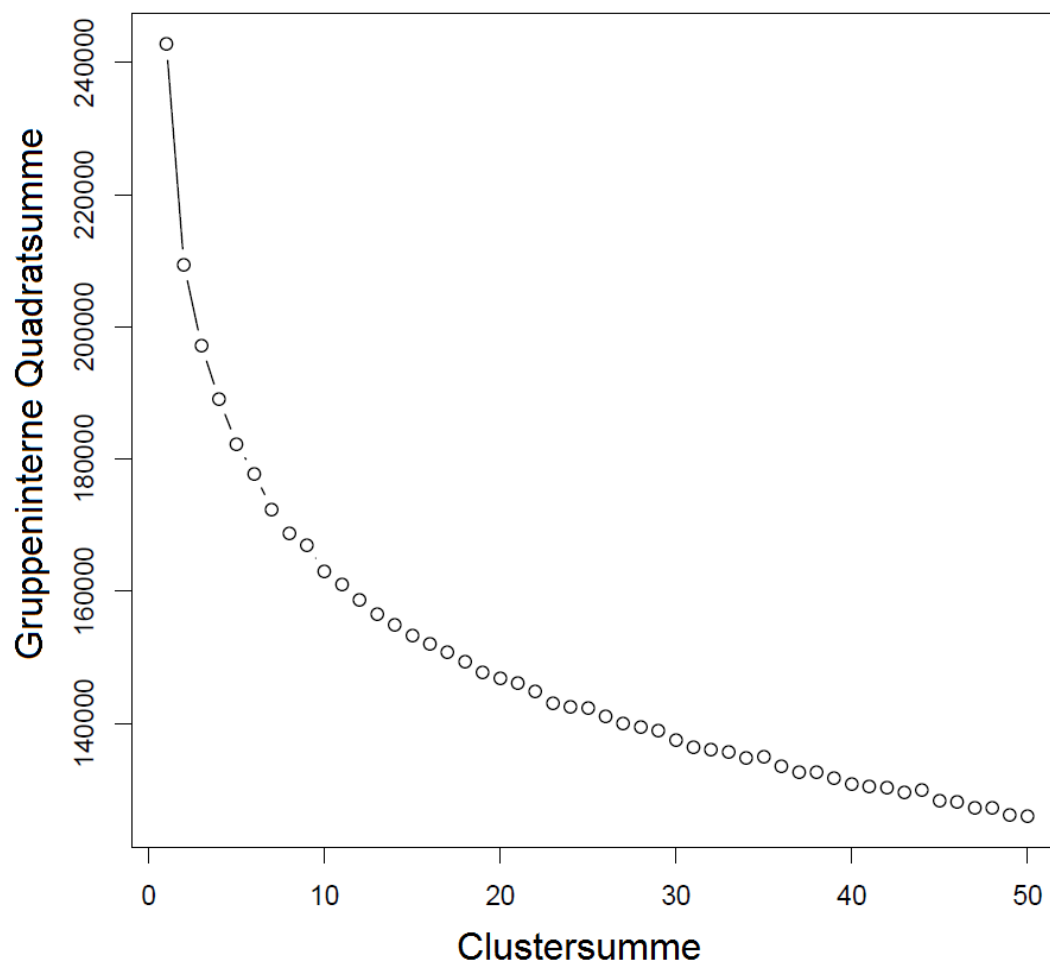


Abbildung B.10: Beispiel für einen Screeplot. - Ein Screeplot, der zur Bestimmung der idealen Clustersumme herangezogen wurde. Der *Elfenbogen* ist bei 22 erkennbar, allerdings nicht sehr stark ausgeprägt.

Anhang C

CD

Die CD beinhaltet die hier aufgelisteten Tabellen im EXCEL-Format.

1. **Tabelle C1** - Logarithmischer *Foldchange* sowie P-Werte aller Gene über alle Vergleiche.
2. **Tabelle C2** - Gene, die pro Experiment differenziell exprimiert waren. Sie bildeten die Basis für das Venn Diagramm.
3. **Tabelle C3** - Logarithmischer *Foldchange* der Grundmodulgene pro Vergleich.
4. **Tabelle C4** - Gene in den Schnittmengen des Venn Diagramms.
5. **Tabelle C5** - Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern.
6. **Tabelle C6** - Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten und indirekten Interaktionspartnern bis zum dritten Grad.
7. **Tabelle C7** - Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten und indirekten Interaktionspartnern bis zum dritten Grad nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus'.
8. **Tabelle C8** - Einteilung der GO angereicherten Terme des Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten

und indirekten Interaktionspartnern bis zur dritten Generation nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus', in Kategorien.

9. **Tabelle C9** - Netzwerk basierend auf ANAP, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern.
10. **Tabelle C10** - Netzwerk basierend auf ANAP, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus'.
11. **Tabelle C11** - Einteilung der GO angereicherten Terme des Netzwerk basierend auf ANAP, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus', in Kategorien.
12. **Tabelle C12** - Netzwerk basierend auf AraNet, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern.
13. **Tabelle C13** - Netzwerk basierend auf AraNet, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus'.
14. **Tabelle C14** - Einteilung der GO angereicherten Terme des Netzwerk basierend auf AraNet, aufbauend auf den Grundmodulgenen sowie den direkten Interaktionspartnern nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus', in Kategorien.
15. **Tabelle C15** - Überschneidungen der an den Subnetzwerken, basierend auf den Grundmodulgenen, beteiligten miRNAs.
16. **Tabelle C16** - Einteilung der Gene, die in mindestens drei Experimenten differenziell reguliert sind, in Cluster unter Nutzung des *kmeans*-Algorithmus'.
17. **Tabelle C17** - Angereicherte GO Terme pro *kmeans* Cluster.
18. **Tabelle C18** - Angereicherte GO Terme pro *kmeans* Cluster, reduziert, sowie deren Einteilung in Kategorien.
19. **Tabelle C19** - Pfade, analysiert von Bioprofiling, pro Cluster

-
20. **Tabelle C20** - Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Genen, welche die lateralen Module ausformen sowie deren direkten Interaktionspartnern.
 21. **Tabelle C21** - Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Genen, welche die lateralen Module ausformen sowie deren direkten Interaktionspartnern, nach Gruppierung der Verknüpfungen mit dem *linkcomm*-Algorithmus'.
 22. **Tabelle C22** - Einteilung der GO angereicherten Terme des Netzwerk basierend auf dem Y2H Datensatz, aufbauend auf den Genen, welche die lateralen Module ausformen sowie deren direkten Interaktionspartnern nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus', in Kategorien.
 23. **Tabelle C23** - Netzwerk basierend auf EXCERBT, aufbauend auf den Genen, welche die lateralen Module ausformen sowie deren direkten Interaktionspartnern.
 24. **Tabelle C24** - Netzwerk basierend auf EXCERBT, aufbauend auf den Genen, welche die lateralen Module ausformen sowie deren direkten Interaktionspartnern, nach Gruppierung der Verknüpfungen mit dem *linkcomm*-Algorithmus'.
 25. **Tabelle C25** - Einteilung der GO angereicherten Terme des Netzwerk basierend auf EXCERBT, aufbauend auf den Genen, welche die lateralen Module formen sowie deren direkten Interaktionspartnern nach Anwendung des *linkcomm*-Algorithmus', in Kategorien.
 26. **Tabelle C26** - Schnittmenge der miRNAs der Netzwerke der Gene, die in mindestens drei Experimenten differenziell reguliert sind, basierend auf EXCERBT und dem Y2H Datensatz.
 27. **Tabelle C27** - miRNAs und Zielgene der verschiedenen Netzwerke, basierend auf den Genen des Grundmoduls sowie den Genen der lateralen Module.

C. CD

Referenzen

- [Abe et al., 2003] Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 63–78. 70
- [Abe et al., 1997] Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., und Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid- regulated gene expression. *Plant Cell*, 9: 1859–1868. 70, 93
- [Ahn et al., 2010] Ahn, Y. Y., Bagrow, J. P., und Lehmann, S. (2010). Link communities reveal multiscale complexity in networks. *Nature*, 466: 761–764. 54
- [Alawady und Grimm, 2005] Alawady, A. E. und Grimm, B. (2005). Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. *Plant J.*, 41: 282–290. 6
- [Allen, 2003] Allen, J. F. (2003). Botany. State transitions - a question of balance. *Science*, 299: 1530–1532. 9
- [An et al., 2010] An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J. R., und Guo, H. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 that requires EIN2 in Arabidopsis. *Plant Cell*, 22: 2384–2401. 2
- [Anderson und Kay, 1995] Anderson, S. L. und Kay, S. A. (1995). Functional dissection of circadian clock- and phytochrome-regulated transcription of the Arabidopsis CAB2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 1500–1504. 45
- [Ankele et al., 2007] Ankele, E., Kindgren, P., Pesquet, E., und Strand, Å. (2007). In vivo visualization of Mg-ProtoporphyrinIX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *Plant Cell*, 19: 1964–1979. 6
- [Antonov, 2011] Antonov, A. V. (2011). BioProfiling.de: analytical web portal for high-throughput cell biology. *Nucl. Acids Res.*, 39: W323–W327. 39, 77, 119
- [Antonov et al., 2008] Antonov, A. V., Dietmann, S., und Mewes, H. W. (2008). KEGG spider: interpretation of genomics data in the context of the global gene metabolic network. *Genome Biol.*, 9: R179. 77, 119
- [Antonov et al., 2009] Antonov, A. V., Dietmann, S., Rodchenkov, I., und Mewes, H. W. (2009). PPI spider: A tool for the interpretation of proteomics data in the context of protein protein interaction networks. *Proteomics*, 9: 2740–2749. 77, 119
- [Antonov et al., 2010] Antonov, A. V., Schmidt, E. E., Dietmann, S., Krestyaninova, M., und Hermjakob, H. (2010). R spider: a network-based analysis of gene lists by combining signaling and metabolic pathways from Reactome and KEGG databases. *Nucleic Acids Res.*, 38: W78–W83. 77, 119
- [Apel und Hirt, 2004] Apel, K. und Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373–399. 8
- [Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011] Arabidopsis Interactome Mapping Consortium (2011). Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science*, 333: 601–607. 54, 56, 59, 119, 164
- [Aranda et al., 2010] Aranda, B., Achuthan, P., Alam-Faruque, Y., Armean, I., Bridge, A., Derow, C., Feuermann, M., Ghanbarian, A. T., Kerrien, S., Khadake, J., Kerssemakers, J., Leroy, C., Menden, M., Michaut, M., Montecchi-Palazzi, L., Neuhäuser, S. N., Orchard, S., Perreau, V., Roechert, B., van Eijk, K., und Hermjakob, H. (2010). The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic Acids Res.*, 38: D525–531. 59, 61, 77
- [Armstrong et al., 2004] Armstrong, J. I., Yuan, S., Dale, J. M., Tanner, V. N., und Theologis, A. (2004). Identification of inhibitors of auxin transcriptional activation by means of chemical genetics in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 14978–14983. 49, 113
- [Ascenzi und Gantt, 1997] Ascenzi, R. und Gantt, J. S. (1997). A drought-stress-inducible histone gene in Arabidopsis thaliana is a member of a distinct class of plant linker histone variants. *Plant Mol. Biol.*, 34: 629–641. 125
- [Ashburner et al., 2000] Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., und Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*, 25: 25–29. 21, 39, 117
- [Axelos et al., 1989] Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C., und Lescure, B. (1989). The gene family encoding the Arabidopsis thaliana translation elongation factor EF-1 alpha: Molecular cloning, characterization and expression. *Mol. Gen. Genet.*, 219: 106–112. 71
- [Bader et al., 2003] Bader, G. D., Betel, D., und Hogue, C. W. (2003). BIND: The biomolecular interaction network database. *Nucleic Acids Res.*, 31: 248–250. 59, 61
- [Baier und Dietz, 2005] Baier, M. und Dietz, K. J. (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *J. Exp. Bot.*, 56: 1449–1462. 89
- [Baier et al., 2004] Baier, M., Ströher, E., und Dietz, K. J. (2004). The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.*, 45: 997–1006. 11, 89

REFERENZEN

- [Barabási und Oltvai, 2004] Barabási, A. L. und Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.*, 5: 101–113. 65, 85
- [Barbazuk et al., 2008] Barbazuk, W. B., Fu, Y., und McGinnis, K. M. (2008). Genome-wide analyses of alternative splicing in plants: opportunities and challenges. *Genome Res.*, 18: 1381–1392. 52, 91
- [Bari et al., 2006] Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., und Scheible, W. R. (2006). PHO2, MicroRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.*, 141: 988–999. 126
- [Bartholomew et al., 1991] Bartholomew, D. M., Bartley, G. E., und Scolnik, P. A. (1991). Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol.*, 96: 291–296. 11
- [Baxter et al., 2007] Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Repsilber, D., Patil, K. R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A. R., und Sweetlove, L. J. (2007). The metabolic response of heterotrophic Arabidopsis cells to oxidative stress. *Plant Physiol.*, 143: 312–325. 124
- [Beckers und Conrath, 2006] Beckers, G. J. M. und Conrath, U. (2006). Microarray data analysis made easy. *Trends Plant Sci.*, 11: 322–323. 114
- [Bellafiore et al., 2005] Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., und Rochaix, J. D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433: 892–895. 9
- [Belles-Boix et al., 2000] Belles-Boix, E., Babychuk, E., van Montagu, M., Inzé, D., und Kushnir, S. (2000). CEO1, a new protein from Arabidopsis thaliana, protects yeast against oxidative damage. *FEBS Lett.*, 482: 19–24. 8
- [Benjamini und Yekutieli, 2001] Benjamini, Y. und Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Statist.*, 29: 1165–1188. 116
- [Bezhanı et al., 2007] Bezhanı, S., Winter, C., Hershman, S., Wagner, J. D., Kennedy, J. F., Kwon, C. S., Pflüger, J., Su, Y., und Wagner, D. (2007). Unique, shared, and redundant roles for the Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *Plant Cell*, 19: 403–416. 126
- [Böhmer und Schroeder, 2011] Böhmer, M. und Schroeder, J. I. (2011). Quantitative transcriptomic analysis of abscisic acid-induced and reactive oxygen species-dependent expression changes and proteomic profiling in Arabidopsis suspension cells. *Plant J.*, 67: 105–118. 49, 113
- [Bolstad et al., 2003] Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Åstrand, M., und Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics*, 19: 185–193. 116
- [Bonardi et al., 2005] Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P., und Leister, D. (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 437: 1179–1182. 28
- [Bonferroni, 1936] Bonferroni, C. E. (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Pubblicazioni Del*
- Royal Istituto Superiore Di Scienze Economiche E Commerciali Di Firenze*, 8: 3–62. 117
- [Boyce et al., 2003] Boyce, J. M., Knight, H., Deyholos, M., Openshaw, M. R., Galbraith, D. W., Warren, G., und Knight, M. R. (2003). The *sfr6* mutant of Arabidopsis is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant J.*, 34: 395–406. 125
- [Bräutigam et al., 2009] Bräutigam, K., Dietzel, L., Kleine, T., Ströher, E., Wormuth, D., Dietz, K. J., Radke, D., Wirtz, M., Hell, R., Dörmann, P., Nunes-Nesi, A., Schauer, N., Fernie, A. R., Oliver, S. N., Geigenberger, P., Leister, D., und Pfannschmidt, T. (2009). Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21: 2715–2732. 125
- [Brazma et al., 2001] Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J., und Vingron, M. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat. Genet.*, 29: 365–371. 17, 113
- [Brown et al., 2005] Brown, B. A., Cloix, C., Jiang, G. H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D. J., und Jenkins, G. I. (2005). A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 18225–18230. 126
- [Busch et al., 2005] Busch, W., Wunderlich, M., und Schöffl, F. (2005). Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, 41: 1–14. 124
- [Bussemaker et al., 2001] Bussemaker, H. J., Li, H., und Sigia, E. D. (2001). Regulatory element detection using correlation with expression. *Nat. Genet.*, 27: 167–171. 44
- [Bustin, 2002] Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, 29: 23–39. 35
- [Bustin et al., 2009] Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., und Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, 55: 611–622. 114
- [Çakir et al., 2003] Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., und Atanassova, R. (2003). A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15: 2165–2180. 89
- [Campbell und Reece, 2003] Campbell, N. A. und Reece, J. B. (2003). *Biologie, 3. Auflage*. Spektrum Verlag. 48
- [Cattell, 1978] Cattell, R. B. (1978). The Scree Test For The Number Of Factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1: 245–276. 117
- [Ceol et al., 2010] Ceol, A., Chatr Aryamontri, A., Licata, L., Peluso, D., Briganti, L., Perfetto, L., Castagnoli, L., und Cesareni, G. (2010). MINT, the molecular interaction database: 2009 update. *Nucl. Acids Res.*, 38: D532–539. 59

- [Chamovitz et al., 1991] Chamovitz, D., Pecker, I., und Hirschberg, J. (1991). The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol. Biol.*, 16: 967–974. 19
- [Charron et al., 2008] Charron, J. B., Ouellet, F., Houde, M., und Sarhan, F. (2008). The plant apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC Plant Biol.*, 8: 86. 124
- [Chen et al., 2010] Chen, K. M., Holmström, M., Raksajit, W., Suorsa, M., Piipo, M., und Aro, E. M. (2010). Small chloroplast-targeted DnaJ proteins are involved in optimization of photosynthetic reactions in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol.*, 10: 43. 125
- [Chen et al., 1997] Chen, Y., Dougherty, E. R., und Bittner, M. L. (1997). Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. *J. Biomed. Opt.*, 2: 364–374. 16
- [Cho et al., 2010] Cho, Y. H., Sheen, J., und Yoo, S. D. (2010). Low glucose uncouples Hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C2H4 responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 152: 1180–1182. 89
- [Cho et al., 2006] Cho, Y. H., Yoo, S. D., und Sheen, J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127: 579–589. 13
- [Cleveland, 1979] Cleveland, W. S. (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Amer. Stat. Assoc.*, 74: 829–836. 116
- [Coen und Meyerowitz, 1991] Coen, E. S. und Meyerowitz, E. M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31–37. 2
- [Costigan et al., 2002] Costigan, M., Befort, K., Karchewski, L., Griffin, R. S., D’Urso, D., Allchorne, A., Sitariski, J., Mannon, J. W., Pratt, R. E., und Woolf, C. J. (2002). Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.*, 3: 16. 116
- [Crimin et al., 2007] Crimin, K., Mckean, J. W., und Sheather, S. J. (2007). Discriminant procedures based on efficient robust discriminant coordinates. *Journal of Nonparametric Statistics*, 19: 199–213. 69, 168
- [Curie et al., 1993] Curie, C., Axelos, M., Bardet, C., Atanassova, R., Chaubet, N., und Lescure, B. (1993). Modular organization and developmental activity of an Arabidopsis thaliana EF-1 alpha gene promoter. *Mol. Gen. Genet.*, 238: 428–436. 71
- [Dai und Zhao, 2011] Dai, X. und Zhao, P. X. (2011). psRNA target: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res.*, 39: W155–159. 120
- [Davletova et al., 2005] Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J., und Mittler, R. (2005). The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 139: 847–856. 125, 128
- [Dean, 1993] Dean, C. (1993). Advantages of Arabidopsis for cloning plant genes. *Philos. T. Roy. Soc. London B*, 342: 189–195. 1
- [Delk et al., 2005] Delk, N. A., Johnson, K. A., Chowdhury, N. I., und Braam, J. (2005). CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca²⁺ sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiol.*, 139: 240–253. 127, 128
- [den Os et al., 2007] den Os, D., Staal, M., , und Elzenga, M. (2007). Signal integration by ABA in the blue light-induced acidification of leaf pavement cells in pea (*Pisum sativum* L. var. *Argenteum*). *Plant Signal Behav.*, 2: 146–152. 72
- [Depège et al., 2003] Depège, N., Bellafiore, S., und Rochaix, J. D. (2003). Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHClI phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, 299: 1572–1575. 9
- [Després et al., 2003] Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., und Fobert, P. R. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, 15: 2181–2191. 71, 93
- [Dietzel et al., 2008] Dietzel, L., Bräutigam, K., und Pfannschmidt, T. (2008). Photosynthetic acclimation: State transitions and adjustment of photosystem stoichiometry - functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS J.*, 275: 1080–1088. 28
- [Dodd et al., 2010] Dodd, A. N., Kudla, J., und Sanders, D. (2010). The Language of Calcium Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61: 593–620. 88
- [Donald und Cashmore, 1990] Donald, R. G. und Cashmore, A. R. (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the Arabidopsis rbcS-1A promoter. *EMBO J.*, 9: 1717–1726. 71
- [Echevarría et al., 2003] Echevarría, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R., und Nathanson, M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.*, 5: 440–446. 88
- [Efetova et al., 2007] Efetova, M., Zeier, J., Riederer, M., Lee, C. W., Stinkl, N., Mueller, M., Hartung, W., Hedrich, R., und Deeken, R. (2007). A central role of abscisic acid in drought stress protection of Agrobacterium-induced tumors on Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 145: 853–862. 127
- [Elemento et al., 2007] Elemento, O., Slonim, N., und Tavaoie, S. (2007). A universal framework for regulatory element discovery across all genomes and data types. *Mol. Cell*, 28: 337–350. 44, 118
- [Escoubas et al., 1995] Escoubas, J. M., Lomas, M., LaRoche, J., und Falkowski, P. G. (1995). Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 10237–10241. 9
- [Estavillo et al., 2011] Estavillo, G. M., Crisp, P. A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E., und Pogson, B. J. (2011). Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23: 3992–4012. 90
- [Eulgem et al., 2000] Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., und Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of

REFERENZEN

- plant transcription factors. *Trends Plant Sci.*, 5: 199–206. 71, 93
- [Everitt und Hothorn, 2006] Everitt, B. S. und Hothorn, T. (2006). *A Handbook of Statistical Analyses Using R, Chapman and Hall/CRC, erste Edition.* Chapman and Hall/CRC, S. 251. 117
- [Fey et al., 2005] Fey, V., Wagner, R., Bräutigam, K., Wirtz, M., Hell, R., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmüller, R., und Pfanschmidt, T. (2005). Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 280: 5318–5328. 9
- [Finkelstein et al., 2002] Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., und Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, S15-S45. 11
- [Fujiki et al., 2000] Fujiki, Y., Ito, M., Nishida, I., und Watanabe, A. (2000). Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation pharmacological analysis of *din* gene expression in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 124: 1139–1148. 127
- [Fujita et al., 2005] Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 3470–3488. 40, 75, 125
- [Furuichi et al., 2001] Furuichi, T., Mori, I. C., Takahashi, K., und Muto, S. (2001). Sugar-induced increase in cytosolic Ca^{2+} in *Arabidopsis* whole plants. *Plant Cell Physiol.*, 42: 1149–1155. 102
- [Galvez-Valdivieso et al., 2009] Galvez-Valdivieso, G., Fryer, M. J., Lawson, T., Slattery, K., Truman, W., Smirnov, N., Asami, T., Davies, W. J., Jones, A. M., Baker, N. R., und Mullineaux, P. M. (2009). The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell*, 21: 2143–2162. 72
- [Garcia-Mata und Lamattina, 2007] Garcia-Mata, C. und Lamattina, L. (2007). Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide*, 17: 143–151. 72
- [Garcion et al., 2006] Garcion, C., Baltensperger, R., Fournier, T., Pasquier, J., Schnetzer, M. A., Gabriel, J. P., und Métraux, J. P. (2006). FiRe and microarrays: a fast answer to burning questions. *Trends Plant Sci.*, 11: 320–322. 114
- [Gentleman et al., 2004] Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R. A., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J. Y., und Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, 5: R80. 116
- [Giraudat et al., 1994] Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P. C., Bouvier-Durand, M., und Vartanian, N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol. Biol.*, 26: 1557–1577. 70, 93
- [González-Pérez et al., 2011] González-Pérez, S., Gutiérrez, J., García-García, F., Osuna, D., Dopazo, J., Lorenzo, O., Revuelta, J. L., und Arellano, J. B. (2011). Early transcriptional defense responses in *Arabidopsis* cell suspension culture under high-light conditions. *Plant Physiol.*, 156: 1439–1456. 49, 113
- [Gould et al., 2008] Gould, S. B., Waller, R. F., und McFadden, G. I. (2008). Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 491–517. 4
- [Gray et al., 1995] Gray, J. C., Sornarajah, R., Zabron, A. A., Duckett, C. M., und Khan, M. S. (1995). *Chloroplast control of nuclear gene expression.* In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol.3, P. Mathis, ed. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers, pp. 543–550. 11, 91
- [Gray et al., 2003] Gray, J. C., Sullivan, J. A., Wang, J. H., Jerome, C. A., und MacLean, D. (2003). Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358: 135–144. 11
- [Griffiths-Jones, 2003] Griffiths-Jones, S. (2003). The microRNA Registry. *Nucl. Acids Res.*, 32: D109–D111. 131, 134, 136, 153, 154
- [Hansen und Grossmann, 2000] Hansen, H. und Grossmann, K. (2000). Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiol.*, 124: 1437–1448. 75
- [Hartigan und Wong, 1979] Hartigan, J. A. und Wong, M. A. (1979). Algorithm AS 136: A k-means clustering algorithm. *App. Stat.*, 28: 100–108. 69, 117
- [Häusler et al., 2009] Häusler, R. E., Geimer, S., Kunz, H. H., Schmitz, J., Dörmann, P., Bell, K., Hetfeld, S., Guballa, A., und Flüge, U. I. (2009). Chlororespiration and grana hyperstacking: how an *Arabidopsis* double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. *Plant Physiol.*, 149: 515–533. 28
- [Hey et al., 2010] Hey, S. J., Byrne, E., und Halford, N. G. (2010). The interface between metabolic and stress signaling. *Ann. Bot. (Oxford, U. K.)*, 105: 197–203. 89, 127
- [Himmelbach et al., 2002] Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Höhener, B., und Grill, E. (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 21: 3029–3038. 71, 93
- [Hirt, 2000] Hirt, H. (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 2405–2407. 89
- [Hou et al., 2008] Hou, X., Hu, W. W., Shen, L., Lee, L. Y., Tao, Z., Han, J. H., und Yu, H. (2008). Global identification of DELLA target genes during *Arabidopsis* flower development. *Plant Physiol.*, 147: 1126–1142. 127, 128
- [Hsu et al., 2009] Hsu, J. L., Wang, L. Y., Wang, S. Y., Lin, C. H., Ho, K. C., Shi, F. K., und Chang, I. F. (2009). Functional phosphoproteomic profiling of phosphorylation sites in membrane fractions of salt-stressed *Arabidopsis thaliana*. *Proteome Sci.*, 7: 42. 124
- [Huang et al., 2009] Huang, D. W., Sherman, B. T., und Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, 37: 1–13. 39

REFERENZEN

- [Huang et al., 2008] Huang, Y. C., Chang, Y. L., Hsu, J. J., und Chuang, H. W. (2008). Transcriptome analysis of auxin-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 420: 118–124. 126
- [Hughes et al., 2000] Hughes, J. D., Estep, P. W., Tavazoie, S., und Church, G. M. (2000). Computational identification of cis-regulatory elements associated with groups of functionally related genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.*, 296: 1205–1214. 44
- [Irizarry et al., 2003] Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., und Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4: 249–264. 16, 116
- [Iwasaki et al., 1995] Iwasaki, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., und Shinozaki, K. (1995). Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 247: 391–398. 70
- [Jack et al., 1992] Jack, T., Brockman, L. L., und Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, 68: 683–697. 45
- [Jakoby et al., 2008] Jakoby, M. J., Falkenhan, D., Mader, M. T., Brininstool, G., Wischnitzki, E., Platz, N., Hudson, A., Hülskamp, M., Larkin, J., und Schnittger, A. (2008). Transcriptional profiling of mature *Arabidopsis* trichomes reveals that NOECK encodes the MIXTA-Like transcriptional regulator MYB106. *Plant Physiol.*, 148: 1583–1602. 125
- [Järvinen et al., 2004] Järvinen, A. K., Hautaniemi, S., Edgren, H., Auvinen, P., Saarela, J., Kallioniemi, O. P., und Monni, O. (2004). Are data from different gene expression microarray platforms comparable? *Genomics*, 83: 1164–1168. 16
- [Jensen et al., 2009] Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., Bork, P., und von Mering, C. (2009). STRING 8: a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.*, 37: D412–D416. 59
- [Jia et al., 2002] Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., und Zhang, J. (2002). Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J. Exp. Bot.*, 53: 2201–2206. 89
- [Jiang et al., 2008] Jiang, S. Y., Ramamoorthy, R., und Ramachandran, S. (2008). Comparative transcriptional profiling and evolutionary analysis of the GRAM domain family in eukaryotes. *Dev. Biol.*, 314: 418–432. 127
- [Jiao et al., 2007] Jiao, Y., Lau, O. S., und Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.*, 8: 217–230. 71
- [Jones-Rhoades et al., 2006] Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., und Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 19–53. 54
- [Jossier et al., 2009] Jossier, M., Bouly, J. P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., und Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 59: 316–328. 127
- [Kachroo und Kachroo, 2009] Kachroo, A. und Kachroo, P. (2009). Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 47: 153–176. 126
- [Kakizaki et al., 2009] Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F. S., Terauchi, R., und Inaba, T. (2009). Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol.*, 151: 1339–1353. 2
- [Kalinka und Tomancak, 2011] Kalinka, A. T. und Tomancak, P. (2011). Linkcomm: an R package for the generation, visualization, and analysis of link communities in networks of arbitrary size and type. *Bioinformatics*, 27: 2011–2012. 54, 80, 119
- [Kalyna et al., 2011] Kalyna, M., Simpson, G. C., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., Marshall, J., Fuller, J., Cardle, L., McNicol, J., Dihm, H. Q., Barta, A., und Brown, J. W. (2011). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.*, 40: 2454–2469. 92
- [Kanehisa und Goto, 2000] Kanehisa, M. und Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28: 27–30. 77
- [Kaplan et al., 2006] Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M. R., Fluhr, R., und Fromm, H. (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca^{2+} transients reveal ABRE-related sequences as Ca^{2+} -responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 2733–2748. 125
- [Karpinski et al., 1997] Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G., und Mullineaux, P. M. (1997). Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell*, 9: 627–640. 8
- [Kasukabe et al., 2004] Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., und Tachibana, S. (2004). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 45: 712–722. 126, 127
- [Katari et al., 2010] Katari, M. S., Nowicki, S. D., Aceituno, F. F., Nero, D., Kelfer, J., Thompson, L. P., Cabello, J. M., Davidson, R. S., Goldberg, A. P., Shasha, D. E., Coruzzi, G. M., und Gutiérrez, R. A. (2010). VirtualPlant: A Software Platform to Support Systems Biology Research. *Plant Physiol.*, 152: 500–515. 39
- [Kerrien et al., 2006] Kerrien, S., Alam-Faruque, Y., Aranda, B., Bancarz, I., Bridge, A., Derow, C., Dimmer, E., Feuermann, M., Friedrichsen, A., Huntley, R., Kohler, C., Khadake, J., Leroy, C., Liban, A., Lieftink, C., Montecchi-Palazzini, L., Orchard, S., Risse, J., Robbe, K., Roehert, B., Thorneycroft, D., Zhang, Y., Apweiler, R., und Hermjakob, H. (2006). IntAct—open source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids Res.*, 35: D561–555. 77
- [Kieber et al., 1993] Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., und Ecker, J. R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, 72: 427–441. 2

REFERENZEN

- [Kirk und Leech, 1972] Kirk, P. R. und Leech, R. M. (1972). Amino acid biosynthesis by isolated chloroplasts during photosynthesis. *Plant Physiol.*, 50: 228–234. 4
- [Kleine et al., 2009] Kleine, T., Voigt, C., und Leister, D. (2009). Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mist? *Trends Genet.*, 25: 185–192. 4
- [Koussevitzky et al., 2007] Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., und Chory, J. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316: 715–719. 11, 48, 113
- [Kozomara und Griffith-Jones, 2011] Kozomara, A. und Griffith-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 39: D152–D157. 54, 120
- [Krieger-Liszkay, 2004] Krieger-Liszkay, A. (2004). Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 56: 337–346. 8
- [Larkin et al., 2003] Larkin, R. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R., und Chory, J. (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science*, 299: 902–906. 2, 6, 27, 106
- [Lee et al., 2005] Lee, B. H., Henderson, D. A., und Zhu, J. K. (2005). The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17: 3155–3175. 126
- [Lee et al., 2010] Lee, I., Ambaru, B., Thakkar, P., Marcotte, E. M., und Rhee, S. Y. (2010). Rational association of genes with traits using a genome-scale gene network for Arabidopsis thaliana. *Nat. Biotechnol.*, 28: 149–156. 61, 119
- [Lee et al., 2007] Lee, K. P., Kim, C., Landgraf, F., und Apel, K. (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 10270–10275. 8, 48, 49, 90, 113
- [Leister, 2012] Leister, D. (2012). Retrograde signaling in plants: from simple to complex scenarios. *Front Plant Sci.*, 3: 135. 22, 90
- [Leonhardt et al., 2004] Leonhardt, N., Kwak, J. M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., und Schroeder, J. I. (2004). Microarray expression analyses of arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive Protein Phosphatase 2C mutant. *Plant Cell*, 16: 596–615. 125
- [Lewandowska et al., 2010] Lewandowska, M., Wawrzyńska, A., Moniuszko, G., Lukomska, J., Zientara, K., Piecho, M., Hodurek, P., Zhukov, I., Liszewska, F., Nikiforova, V., und Sirko, A. (2010). A contribution to identification of novel regulators of plant response to sulfur deficiency: characteristics of a Tobacco gene UP9C, its protein product and the effects of UP9C silencing. *Mol. Plant*, 3: 347–360. 128
- [Li et al., 2009] Li, X. F., Li, Y. J., An, Y. H., Xiong, L. Y., Shao, X. H., Wang, Y., und Sun, Y. (2009). AKIN1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism and sugar signaling in Arabidopsis. *J. Integr. Plant Biol.*, 51: 513–520. 127
- [Li et al., 2002] Li, Y., Darley, C. P., Ongaro, V., Fleming, A., Schipper, O., Baldauf, S. L., und McQueen-Mason, S. J. (2002). Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiol.*, 128: 854–864. 125
- [Li et al., 2006] Li, Y., Lee, K. K., Walsh, S., Smith, C., Hadingham, S., Sorefan, K., Cawley, G., und Bevan, M. W. (2006). Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res.*, 16: 414–427. 70, 71
- [Louvet et al., 2006] Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guénin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerneau, F., und Peloux, J. (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 224: 782–791. 128
- [Lu et al., 2011] Lu, Y., Savage, L. J., Larson, M. D., Wilkerson, C. G., und Last, R. L. (2011). Chloroplast 2010: a database for large-scale phenotypic screening of Arabidopsis mutants. *Plant Physiol.*, 155: 1589–1600. 39
- [Mano und Nemoto, 2012] Mano, Y. und Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.*, 63: 2853–2872. 88
- [Marquez et al., 2012] Marquez, Y., Brown, J. W., Simpson, C., Barta, A., und Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Res.*, 22: 1184–1195. 52, 53
- [Martínez und Chrispeels, 2003] Martínez, I. M. und Chrispeels, M. J. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*, 15: 561–576. 125
- [Matthews et al., 2009] Matthews, L., Gopinath, G., Gillespie, M., Caudy, M., Croft, D., de Bono, B., Garapati, P., Hemish, J., Hermjakob, H., Jassal, B., Kanapin, A., Lewis, S., Mahajan, S., May, B., Schmidt, E., Vastrik, I., Wu, G., Birney, E., Stein, L., und D’Eustachio, P. (2009). Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes. *Nucleic Acids Res.*, 37: D619–622. 77
- [McCord und Fridovich, 1969] McCord, J. M. und Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244: 6049–6055. 8
- [McFadden, 2001] McFadden, G. I. (2001). Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.*, 37: 951–959. 4
- [Meinke et al., 1998] Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., und Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, 282: 662–682. 1
- [Mewes et al., 2010] Mewes, H. W., Ruepp, A., Theis, F., Rattei, T., Walter, M., Frishman, D., Suhre, K., Spanagl, M., Mayer, K. F. X., Stümpflen, V., und Antonov, A. V. (2010). MIPS: curated databases and comprehensive secondary data resources in 2010. *Nucl. Acids Res.*, 39: D220–D224. 80
- [Michaut et al., 2008] Michaut, M., Kerrien, S., Montecchi-Palazzi, L., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., Aude, J. C., Legrain, P., und Hermjakob, H. (2008). InterPORC: automated inference of highly conserved protein interaction networks. *Bioinformatics*, 24: 1625–1631. 59

- [Mittler, 2002] Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405–410. 89
- [Mochizuki et al., 2008] Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T., und Nagatani, A. (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 15184–15189. 6
- [Mølhøj et al., 2004] Mølhøj, M., Verma, R., und Reiter, W. D. (2004). The biosynthesis of D-Galacturonate in plants. Functional cloning and characterization of a membrane-anchored UDP-D-Glucuronate 4-Epimerase from Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 135: 1221–1230. 124
- [Morgenstern et al., 1998] Morgenstern, B., Frech, K., Dress, A., und Werner, T. (1998). DIALIGN: finding local similarities by multiple sequence alignment. *Bioinformatics*, 14: 290–294. 44
- [Moulin et al., 2008] Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J., und Smith, A. G. (2008). Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 15178–15183. 6
- [Murashige und Skoog, 1962] Murashige, T. und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473–497. 105
- [Nagata et al., 2005] Nagata, T., Yamada, H., Du, Z., Todoriki, S., und Kikuchi, S. (2005). Microarray analysis of genes that respond to γ -irradiation in Arabidopsis. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1022–1030. 126, 127
- [Nawrath et al., 2002] Nawrath, C., Heck, S., Parinshawong, N., und Métraux, J. P. (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell*, 14: 275–286. 126
- [Nicolai et al., 2006] Nicolai, M., Rocanto, M. A., Canoy, A. S., Roquié, D., Sarda, X., Freyssonet, G., und Robaglia, C. (2006). Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in Arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiol.*, 141: 663–673. 124
- [Nishizawa et al., 2008] Nishizawa, A., Yabuta, Y., und Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.*, 147: 1251–1263. 127
- [Niyogi, 1999] Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 333–359. 8
- [Noctor und Foyer, 1998] Noctor, G. und Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249–279. 8
- [Nomura et al., 2008] Nomura, H., Komori, T., Kobori, M., Nakahira, Y., und Shiina, T. (2008). Evidence for chloroplast control of external Ca^{2+} -induced cytosolic Ca^{2+} transients and stomatal closure. *Plant J.*, 53: 988–998. 88
- [Nomura et al., 2012] Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, I. N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y., und Shiina, T. (2012). Chloroplast-mediated activation of plant immune signaling in Arabidopsis. *Nat. Comm.*, 3: 926. 98
- [Nott et al., 2006] Nott, A., Jung, H. S., Koussevitzky, S., und Chory, J. (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 739–759. 6, 19, 91
- [O'Connor et al., 1995] O'Connor, T. R., Dyreson, C., und Wyrick, J. J. (1995). Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences. *Bioinformatics*, 21: 4411–4413. 118
- [Oelmüller et al., 1986] Oelmüller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V. K., und Mohr, H. (1986). Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta*, 168: 482–492. 11
- [Ogawa et al., 2007] Ogawa, D., Nakajima, N., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Kamada, H., und Saji, H. (2007). The isochorismate pathway is negatively regulated by salicylic acid signaling in O₃-exposed Arabidopsis. *Planta*, 226: 1277–1285. 126
- [Olsson et al., 2003] Olsson, T., Thelander, M., und Ronne, H. (2003). A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem.*, 278: 44439–44447. 13
- [op den Camp et al., 2003] op den Camp, R. G., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, É., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M., und Apel, K. (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15: 2320–2332. 8
- [Osakabe et al., 2005] Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K., und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 17: 1105–1119. 124
- [Osuna et al., 2007] Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. E., Höhne, M., Günter, M., Kamalage, B., Trethewey, R., Scheible, W. R., und Stitt, M. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived Arabidopsis seedlings. *Plant J.*, 49: 463–491. 125, 127
- [Overington, 2009] Overington, J. (2009). ChEMBL. An interview with John Overington, team leader, chemogenomics at the European Bioinformatics Institute Outstation of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI). Interview by Wendy A. Warr. *J. Comput Aided Mol. Des.*, 23: 195–198. 59
- [Overvoorde et al., 2005] Overvoorde, P. J., Okushima, Y., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Liu, A., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., und Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 17: 3282–3300. 125, 126
- [Pasternak et al., 2005] Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., und Jansen, M. A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J. Exp. Bot.*, 56: 1991–2001. 89

REFERENZEN

- [Pei et al., 2000] Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thominé, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E., und Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406: 731–774. 11
- [Pesaresi et al., 2009] Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ichnatowicz, A., Bonardi, V., Scharfenberg, M., Schneider, A., Pfannschmidt, T., und Leister, D. (2009). Arabidopsis STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *Plant Cell*, 21: 2402–2423. 9, 19, 28
- [Pesaresi et al., 2007] Pesaresi, P., Schneider, A., Kleine, T., und Leister, D. (2007). Interorganellar communication. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 600–606. 91
- [Peter and Grimm, 2009] Peter, E. und Grimm, B. (2009). GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis. *Mol. Plant*, 2: 1198–1210. 6
- [Pfannschmidt, 2003] Pfannschmidt, T. (2003). Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.*, 8: 33–41. 4, 9
- [Pfannschmidt, 2010] Pfannschmidt, T. (2010). Plastidial retrograde signalling - a true plastid factor or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci.*, 15: 427–435. 4, 19, 22, 48, 88, 91, 103
- [Pfannschmidt et al., 1999] Pfannschmidt, T., Nilsson, A., und Allen, J. F. (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, 397: 625–628. 9
- [Pogson et al., 2008] Pogson, B. J., Woo, N. S., Förster, B., und Small, I. D. (2008). Plastid signaling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci.*, 13: 602–609. 28, 101
- [Prieto and de Las Rivas, 2006] Prieto, C. und de Las Rivas, J. (2006). APID: Agile Protein Interaction DataAnalyzer. *Nucleic Acids Res.*, 34: W298–302. 59
- [Qin, 2006] Qin, Z. S. (2006). Clustering microarray gene expression data using weighted Chinese restaurant process. *Bioinformatics*, 22: 1988–1997. 69
- [Quackenbush, 2002] Quackenbush, J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.*, 32 Suppl.: 496–501. 15
- [Ramel et al., 2012] Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C., und Havaux, M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109: 5535–5540. 90
- [Razick et al., 2008] Razick, S., Magklaras, G., und Donaldson, I. M. (2008). iRefIndex: a consolidated protein interaction database with provenance. *BMC Bioinformatics*, 9: 405. 59
- [Ribeiro et al., 2012] Ribeiro, D. M., Araújo, W. L., Fernie, A. R., Schippers, J. H., und Mueller-Roeber, B. (2012). Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, 63: 2769–2786. 49, 113
- [Ringli et al., 2001] Ringli, C., Keller, B., und Ryser, U. (2001). Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 1430–1441. 125
- [Rodriguez Milla et al., 2003] Rodriguez Milla, M. A., Maurer, A., Rodriguez Huete, A., und Gustafson, J. P. (2003). Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J.*, 36: 602–615. 11
- [Rook et al., 2006] Rook, F., Hadingham, S. A., und Bevan, M. W. (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.*, 29: 426–434. 89
- [Rösti et al., 2007] Rösti, J., Barton, C. J., Albrecht, S., Dupree, P., Pauly, M., Findlay, K., Roberts, K., und Seifert, G. J. (2007). UDP-Glucose 4-Epimerase isoforms UGE2 and UGE4 cooperate in providing UDP-Galactose for cell wall biosynthesis and growth of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 19: 1565–1579. 124
- [Rouhier et al., 2008] Rouhier, N., Lemaire, S. D., und Jacquot, J. P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 143–166. 126
- [Ruckle et al., 2007] Ruckle, M. E., DeMarco, S. M., und Larkin, R. M. (2007). Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19: 3944–3960. 48, 91
- [Saibo et al., 2003] Saibo, N. J., Vriezen, W. H., Beemster, G. T., und Van Der Straeten, D. (2003). Growth and stomata development of Arabidopsis hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J.*, 33: 989–1000. 88
- [Sánchez et al., 2004] Sánchez, J. P., Duque, P., und Chua, N. H. (2004). ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis. *Plant J.*, 38: 381–395. 124, 125
- [Sandelin et al., 2004] Sandelin, A., Alkema, W., Engström, P., Wasserman, W. W., und Lenhard, B. (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.*, 32: D91–94. 44, 70, 118
- [Sassolas et al., 2008] Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D., und Blum, L. J. (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chem. Rev.*, 108: 109–139. 18
- [Sato et al., 1999] Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., und Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of Arabidopsis thaliana. *DNA Res.*, 6: 283–290. 4
- [Sattler et al., 2006] Sattler, S. E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E. E., Kriskche, M., Mueller, M. J., und DellaPenna, D. (2006). Nonenzymatic lipid peroxidation reprograms gene expression and activates defense markers in Arabidopsis tocopherol-deficient mutants. *Plant Cell*, 18: 3706–3720. 126
- [Scheda et al., 1995] Scheda, M., Shalon, D., Davis, R. W., und Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270: 467–470. 14
- [Schindler et al., 1992] Schindler, U., Beckmann, H., und Cashmore, A. R. (1992). TGAl and G-Box binding factors: Two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-Box-like element TGACGTGG. *Plant Cell*, 4: 1309–1319. 71

- [Schluepmann et al., 2004] Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M., und Smeekens, S. (2004). Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.*, 135: 879–890. 128
- [Schmitz, 2011] Schmitz, J. (2011). *Untersuchungen zur Hochlicht-Akklimatisierung von Arabidopsis thaliana Mutanten mit Defekten im Kohlenhydratstoffwechsel*. Dissertation, Universität Köln, Köln. 108
- [Schneider et al., 2002] Schneider, A., Häusler, R. E., Kolkisaoglu, U., Kunze, R., van der Graaff, E., Schwacke, R., Catoni, E., Desimone, M., und Flügge, U. I. (2002). An Arabidopsis thaliana knock-out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J.*, 32: 685–699. 28
- [Schwager et al., 2007] Schwager, K. M., Calderon-Villalobos, L. I., Dohmann, E. M., Willige, B. C., Knierer, S., Nill, C., und Schwechheimer, C. (2007). Characterization of the VIER F-BOX PROTEINE genes from Arabidopsis reveals their importance for plant growth and development. *Plant Cell*, 19: 1163–1178. 126
- [Schwarzländer et al., 2012] Schwarzländer, M., König, A. C., Sweetlove, L. J., und Finkemeier, I. (2012). The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses. *J. Exp. Bot.*, 63: 1735–1750. 4
- [Seifert et al., 2002] Seifert, G. J., Barber, C., Wells, B., Dolan, L., und Roberts, K. (2002). Galactose biosynthesis in Arabidopsis: Genetic evidence for substrate channeling from UDP-D-Galactose into cell wall polymers. *Curr. Biol.*, 12: 1840–1845. 124
- [Shaffer, 1995] Shaffer, J. P. (1995). Multiple Hypothesis Testing. *Annu. Rev. Psychol.*, 46: 561–584. 117
- [Shaikhali et al., 2008] Shaikhali, J., Heiber, I., Seidel, T., Ströher, E., Hiltcher, H., Birkmann, S., Dietz, K. J., und Baier, M. (2008). The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxidase A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biol.*, 8: 48. 28
- [Shannon et al., 2003] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., und Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13: 2498–2504. 120
- [Sharma et al., 2007] Sharma, N., Cram, D., Huebert, T., Zhou, N., und Parkin, I. A. (2007). Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plants response to cold stress. *Plant Mol. Biol.*, 63: 171–184. 124, 128
- [Shuai et al., 2002] Shuai, B., Reynaga-Peña, C. G., und Springer, P. S. (2002). The LATERAL ORGAN BOUNDARIES gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.*, 129: 747–761. 128
- [Simpson et al., 2003] Simpson, S. D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.*, 33: 259–270. 70
- [Smeekens, 2000] Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 49–81. 89
- [Smyth, 2004] Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, 3: Article 3. 16, 116
- [Söderman et al., 1999] Söderman, E., Hjellström, M., Fahleson, J., und Engström, P. (1999). The HD-Zip gene *ATHB6* in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol Biol.*, 40: 1073–1083. 71
- [Son et al., 2010] Son, O., Cho, S. K., Kim, S. J., und Kim, W. T. (2010). In vitro and in vivo interaction of AtRma2 E3 ubiquitin ligase and auxin binding protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 393: 492–497. 126
- [Sottosanto et al., 2004] Sottosanto, J. B., Gelli, A., und Blumwald, E. (2004). DNA array analyses of Arabidopsis thaliana lacking a vacuolar Na^+/H^+ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant J.*, 40: 752–771. 126
- [Stark et al., 2011] Stark, C., Breitkreutz, B. J., Chatr-Aryamontri, A., Boucher, L., Oughtred, R., Livstone, M. S., Nixon, J., Van Auken, K., Wang, X., Shi, X., Reguly, T., Rust, J. M., Winter, A., Dolinski, K., und Tyers, M. (2011). The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.*, 39: D698–704. 59
- [Stark et al., 2006] Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., und Tyers, M. (2006). BioGRID: A general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.*, 34: D535–539. 59
- [Strand et al., 2003] Strand, Å., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R., und Chory, J. (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature*, 421: 79–83. 6, 20
- [Sugimoto et al., 1997] Sugimoto, T., Stewart, S., und Guan, K. L. (1997). The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase Calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 272: 29415–29418. 127
- [Susek et al., 1993] Susek, R. E., Ausubel, F. M., und Chory, J. (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74: 787–799. 2, 6, 11, 106
- [Suzuki et al., 2005] Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., und Mittler, R. (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator Multiprotein Bridging Factor 1c. *Plant Physiol.*, 139: 1313–1322. 125
- [Swarbreck et al., 2008] Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., Garcia-Hernandez, M., Foerster, H., Li, D., Meyer, T., Muller, R., Ploetz, L., Radenbaugh, A., Singh, S., Swing, V., Tissier, C., Zhang, P., und Huala, E. (2008). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucl. Acids Res.*, 36: D1009–1014. 61
- [Swarup et al., 2008] Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., de Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R.,

REFERENZEN

- Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J. D., Taylor, C. G., Schachtman, D. P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplace, L., und Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.*, 10: 946–954. 124
- [Syed et al., 2012] Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., und Brown, J. W. (2012). Alternative splicing in plants - coming of age. Epub vor Druck. 52, 91
- [Szkarczyk et al., 2011] Szkarczyk, D., Franceschini, A., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Minguez, P., Doerks, T., Stark, M., Muller, J., Bork, P., Jensen, L. J., und von Mering, C. (2011). The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.*, 39: D561–D568. 59
- [Tan et al., 2007] Tan, X., Meyers, B. C., Kozik, A., West, M. A., Morgante, M., St. Clair, D. A., Bent, A. F., und Michelmore, R. W. (2007). Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.*, 7: 56. 124
- [Terzaghi und Cashmore, 1995] Terzaghi, W. B. und Cashmore, A. R. (1995). Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 445–474. 45, 71
- [The Arabidopsis Genome Initiative, 2000] The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408: 796–815. 1
- [Thimm et al., 2004] Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., und Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.*, 37: 914–939. 39
- [Tilly et al., 1998] Tilly, J. J., Allen, D. W., und Jack, T. (1998). The CARG boxes in the promoter of the Arabidopsis floral organ identity gene APETALA3 mediate diverse regulatory effects. *Development*, 125: 1647–1657. 45
- [Tremousaygue et al., 1999] Tremousaygue, D., Manevski, A., Bardet, C., Lescure, N., und Lescure, B. (1999). Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J.*, 20: 553–561. 71
- [Tseng et al., 2001] Tseng, G. C., Oh, M. K., Rohlin, L., Liao, J. C., und Wong, W. H. (2001). Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.*, 29: 2549–2557. 16
- [Ugartechea-Chirino et al., 2010] Ugartechea-Chirino, Y., Swarup, R., Swarup, K., Péret, B., Whitworth, M., Bennett, M., und Bougourd, S. (2010). The AUX1 LAX family of auxin influx carriers is required for the establishment of embryonic root cell organization in Arabidopsis thaliana. *Ann. Bot. (Oxford, U. K.)*, 105: 277–289. 124
- [Usadel et al., 2008] Usadel, B., Bläsing, O. E., Gibon, Y., Retzlaff, K., Höhne, M., Günther, M., und Stitt, M. (2008). Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. *Plant Physiol.*, 146: 1834–1861. 40, 125, 126, 127, 128
- [Vandenbussche et al., 2010] Vandenbussche, F., Petrášek, J., Žádníková, P., Hoyerová, K., Pešek, B., Raz, V., Swarup, R., Bennett, M., Zažímalová, E., Benková, E., und Van Der Straaten, D. (2010). The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in Arabidopsis thaliana seedlings. *Development*, 137: 597–606. 124
- [Vartanian et al., 1994] Vartanian, N., Marcotte, L., und Giraudat, J. (1994). Drought rhizogenesis in Arabidopsis thaliana. Differential Responses of Hormonal Mutants. *Plant Physiol.*, 104: 761–767. 75
- [Vogel et al., 1998] Vogel, G., Aeschbacher, R. A., Müller, J., Boller, T., und Wiemken, A. (1998). Trehalose-6-phosphate phosphatases from Arabidopsis thaliana: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.*, 13: 673–683. 128
- [Walters et al., 2003] Walters, R. G., Shephard, F., Rogers, J. J., Rolfe, S. A., und Horton, P. (2003). Identification of mutants of Arabidopsis defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiol.*, 131: 472–481. 13, 28
- [Wang und Brendel, 2006] Wang, B. B. und Brendel, V. (2006). Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 7175–7180. 52, 91
- [Wang et al., 2012] Wang, C., Marshall, A., Zhang, D., und Wilson, Z. A. (2012). ANAP: An integrated knowledge base for Arabidopsis protein interaction network analysis. *Plant Physiol.*, 158: 1523–1533. 52, 59, 119, 165, 166
- [Weatherwax et al., 1996] Weatherwax, S. C., Ong, M. S., Degenhardt, J., Bray, E. A., und Tobin, E. M. (1996). The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol.*, 111: 363–370. 11
- [Weisshaar et al., 1991] Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., da Costa e Silva, O., und Hahlbrock, K. (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.*, 10: 1777–1786. 71
- [Woodson und Chory, 2008] Woodson, J. D. und Chory, J. (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.*, 9: 383–395. 4
- [Xenarios et al., 2000] Xenarios, I., Rice, D. W., Salwinski, L., Baron, M. K., Marcotte, E. M., und Eisenberg, D. (2000). DIP: The database of interacting proteins. *Nucleic Acids Res.*, 28: 289–291. 59
- [Xenarios et al., 2002] Xenarios, I., Salwinski, L., Duan, X. J., Higney, P., Kim, S. M., und Eisenberg, D. (2002). DIP, the Database of Interacting Proteins: A research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, 30: 303–305. 59
- [Xin et al., 2005] Xin, Z., Zhao, Y., und Zheng, Z. L. (2005). Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 Small GTPase in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 139: 1350–1365. 125
- [Xue et al., 2008] Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehrling, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C., und Zhong, Y. (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics*, 9: 550. 126

- [Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993] Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 238: 17–25. 11, 70
- [Yazaki et al., 2003] Yazaki, J., Kishimoto, N., Nagata, Y., Ishikawa, M., Fujii, F., Hashimoto, A., Shimbo, K., Shimatani, Z., Kojima, K., Suzuki, K., Yamamoto, M., Honda, S., Endo, A., Yoshida, Y., Sato, Y., Takeuchi, K., Toyoshima, K., Miyamoto, C., Wu, J., Sasaki, T., Sakata, K., Yamamoto, K., Iba, K., Oda, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., und Kikuchi, S. (2003). Genomics approach to abscisic acid- and gibberellin-responsive genes in rice. *DNA Res.*, 10: 249–261. 71
- [Yoon et al., 2004] Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., und Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.*, 21: 809–818. 4
- [Zeevaart und Creelman, 1988] Zeevaart, J. A. D. und Creelman, R. A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39: 439–473. 11
- [Zhang et al., 2006] Zhang, J., Jia, W., Yang, J., und Ismail, A. M. (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crop. Res.*, 97: 111–119. 11
- [Zhang et al., 2010] Zhang, Z. W., Yuan, S., Xu, F., Yang, H., Zhang, N. H., Cheng, J., und Lin, H. H. (2010). The plastid hexokinase pHXK: A node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.*, 584: 3573–3579. 13
- [Zhao et al., 2003] Zhao, Y., Dai, X., Blackwell, H. E., Schreiber, S. L., und Chory, J. (2003). SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science*, 301: 1107–1110. 127
- [Zheng et al., 2006] Zheng, W., Zhai, Q., Sun, J., Li, C. B., Zhang, L., Li, H., Zhang, X., Li, S., Xu, Y., Jiang, H., Wu, X., und Li, C. (2006). Bestatin, an inhibitor of aminopeptidases, provides a chemical genetics approach to dissect jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 141: 1400–1413. 124
- [Zik und Irish, 2003] Zik, M. und Irish, V. F. (2003). Global identification of target genes regulated by APETALA3 and PISTILLATA floral homeotic gene action. *Plant Cell*, 15: 207–222. 125, 127

REFERENZEN

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie, abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Hans-Werner Mewes betreut worden.

München,

(Christine Gläßer)

Publikationen und Posterpräsentationen

1. Eva Gehrman, **Christine Gläßer**, Yaochu Jin, Bernhard Sendhoff, Barbara Drossel, Kay Hamacher (2011). *Robustness of glycolysis in yeast to internal and external noise*. Phys. Rev. E 84, 021913.
2. **Christine Gläßer**, Georg Haberer, Klaus F.X. Mayer, DFG Forschungsgruppe FOR804 (09, 2011). *Retrograde Signaling in Plants: its nature and contributing pathways*. Posterpräsentation GCB - German Conference on Bioinformatics 2011, Weihenstephan.
3. Olaf Czarnecki, **Christine Gläßer**, Jin-Gui Chen, Klaus F. Mayer, Bernhard Grimm (2012). *Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signalling*. Front. Plant Sci. 3: 236
4. **Christine Gläßer**, Georg Haberer, Iris Finkemeier, Tatjana Kleine, Dario Leister, Karl-Josef Dietz, Rainer E. Häusler, Bernhard Grimm, Thomas Pfanschmidt, Klaus F.X. Mayer. *A Meta-Analysis of Retrograde Signaling in Arabidopsis thaliana reveals a core module of genes embedded in complex cellular signaling networks*. In Submission.

Lebenslauf

Christine Gläßer

E-Mail: ChristineGlaesser@gmx.net

Geburtsdatum, -ort: 27.11.1984, Darmstadt (Hessen)

Ausbildung

seit 01/2010	Promotion am Helmholtz Zentrum München Thema: Globale Analyse transkriptionaler regulatorischer Netzwerke bei der retrograden Signaltransduktion
12/08 - 08/09	Diplomarbeit bei der Honda Research Institute Europe GmbH Thema: Analysis and Modeling of the glycolysis of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10/04 - 08/09	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt Abschlussprüfungen in den Fächern Genetik, Zoologie/Tierphysiologie und Bionik
06/04	Abitur am Edith-Stein-Gymnasium Darmstadt
08/95 - 06/04	Besuch des Edith-Stein-Gymnasiums Darmstadt

