

AUSWIRKUNG VON ARSEN IN REIS: VERBINDUNG ZWISCHEN TRANSKRIPTIONELLER REGULATION UND PROTEINBIOSYNTHESE

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Jochen Friedemann Eisele

aus Ostfildern

Tübingen

2015

Tag der mündlichen Qualifikation:

24.06.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Harter

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Kappler

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	VI
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 English Summary	2
2. EINLEITUNG	4
2.1 Problematik: Arsenbelastung von Reispflanzen	4
2.2 Phänotypen im Zusammenhang mit Arsenintoxikationen	5
2.3 Arsenaufnahme und toxische Effekte	6
2.4 Entgiftungsstoffwechsel der Pflanze bei Arsenintoxikation	8
2.5 Glutathion, der Aufbau und die Aufgaben	10
2.6 Auslöser und Entstehungsorte von oxidativem Stress	12
2.7 Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies	12
2.8 Atmungskette und die Kopplung von Citratzyklus und Glykolyse	15
2.9 Molekularbiologische Änderungen bei Arsenintoxikation	19
2.10 Vergleich von verschiedenen Methoden zur Untersuchung des Proteoms	22
3. ZIELSETZUNG	24
4. MATERIAL UND METHODEN	25
4.1 Material, Geräte, Software und Datenbanken	25
4.1.1 Chemikalien	25
4.1.2 Enzyme	27
4.1.3 Geräte	27
4.1.4 Programme	28
4.1.5 Datenbanken	28
4.1.6 Organismen	29

4.2	Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für die Analysen der Morphologie und Keimung unter Arseneinfluss	29
4.3	Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für die Untersuchung des Phänotyps	29
4.4	Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für die Untersuchung des Proteoms	30
4.5	Färbemethoden der Wurzeln	31
4.6	Messung der Metaboliten	31
4.7	Probengewinnung für Proteommessungen, Langzeit- und Kurzzeitbehandlung	32
4.7.1	Proteinisolation und Mischen der verschiedenen Proben (schematisch)	34
4.7.2	Anreicherung der Kern- und Zellorganellenfraktion und Proteinisolation	36
4.8	Prozessieren der Rohdaten aus den massenspektrometrischen Messungen	37
4.8.1	Kombinieren von Daten technischer Replikate	38
4.8.2	Verhalten der Kontrolldaten unterschiedlicher hydroponischer Kulturen	39
4.9	Statistik zur Differenzierung von Kontrollen und der in ihrer Abundanz veränderten Proteine	41
4.9.1	Vorgehen bei der statistischen Auswertung	41
4.9.2	Statistische Auswertung der Proteomdaten von kurzzeitbehandelten Pflanzen	42
4.9.3	Voraussetzungen für die Vereinigung von Daten	42
4.9.4	Kriterien für ein in der Abundanz verändertes Protein	43
4.9.5	Darstellung der Daten und das Einordnen in Stoffwechselabläufe	43
5.	ERGEBNISSE	45
5.1	Auswirkungen von Arsenat auf die Keimung, das Wurzel- und Sprosswachstum	45
5.2	Phänotypische Veränderungen der Reisswurzel infolge einer Arsenintoxikation	48
5.3	Metabolomik: Die Veränderungen von Metaboliten des Zucker-, Aminosäure- und Sekundärstoffwechsels in arsenbehandelten Reisswurzeln	56
5.4	Proteomik: Die Veränderungen der Proteinmengen durch Arsenbehandlung	61
5.4.1	Ideale Datenverteilung der quantifizierten Proteine bei der Gegenüberstellung reziproker Messungen	62
5.4.2	Reale Datenverteilung der quantifizierten Proteine bei der Gegenüberstellung reziproker Messungen	64

5.4.3	Gegenüberstellung der reziproken Messungen	65
5.4.4	Langzeitbehandlung mit Arsenat induziert quantitative Veränderungen der Proteinzusammensetzung in der Reisswurzel	68
5.4.5	Langzeitbehandlung von Reispflanzen mit Arsenat und die induzierten quantitativen Veränderungen der Proteinzusammensetzung in den Sprossen	82
5.4.6	Vergleich der Proteomdaten mit anderen Studien	84
6.	DISKUSSION	87
6.1	Veränderte Keimung und Reduktion von Wurzel- und Sprosswachstum	87
6.2	Phänotypische Veränderungen der Reisswurzel infolge einer Arsenintoxikation	88
6.3	Metabolomik und ihre Zuordnung	90
6.4	Übersicht über die durchgeführten Proteomikansätze und ihre Ergebnisse	91
6.5	Proteomik und ihre Zuordnung	93
6.5.1	Änderungen im Energiestoffwechsel	93
6.5.2	Arsen induzierter oxidativer Stress und die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	97
6.5.3	Epigenetische Effekte bei Arsenintoxikation	98
6.5.4	Veränderungen im Hormonhaushalt	100
6.5.5	Anpassungen in der Translation an Arsenstress	101
6.5.6	Sekundärmetabolismus und die Anpassung der Zellwand	102
6.5.7	Weitere in der Abundanz veränderte Proteine und die Hürden bei der Zuordnung	102
6.6	Resümee	103
7.	LITERATURVERZEICHNIS	105
8.	ANHANG	112
8.1	Vergleich zweier technischer Replikate	112
8.1.2	Wurzeln	116
8.1.3	Spross	128
8.2	Daten der quantitativen Metabolommessungen	131
8.2.1	Venn-Diagramme: Die Schnittmenge der identifizierten Proteine zwischen den Kontrollen und den reziproken Messungen.	135
8.3	Quellen der verwendeten Bilder	137
	DANKSAGUNG	138

ABKÜRZUNGEN

μM	mikromolar
^{14}N	Stickstoffatom mit 7 Neutronen, wie es zum größten Teil natürlich vorkommt (99,63% [1])
^{15}N	stabiles Isotop von Stickstoff (mit 8 Neutronen)
1-Arseno-3-PG	1-Arsenato-3-Phospho-D-Glycerat
2D-Gel	Zweidimensionales Polyacrylamid-Gel
3GP	D-3-Phosphoglycerat
6-AGL	6-Arsenogluconolacton
ADP-AsO ₄ ²⁻	ADP-Arsenat
APX	Ascorbat-Peroxidase
As	Arsen
ASC	Ascorbat
ASC _{ox}	Semidehydroascorbat/ Dehydroascorbat
AsO ₃ ³⁻	Arsenit
AsO ₄ ³⁻	Arsenat
ATP/ADP	Adenosintriphosphat/-diphosphat
bzw.	beziehungsweise
CDC25	Cell Division Cycle 25 (eine Tyrosinkinase, die an der Koordination der Zellzyklus' beteiligt ist)
Cyt _c	Cytochrom c
Da	Dalton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHAR	Dehydroascorbatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
eIF3	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 3 (<i>eukaryotic translation initiation factor 3</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
etc.	et cetera
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glu-6-AsO ₄ ²⁻	Glukose-6-Arsenat
Glu-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GP	Glycerin-3-Phosphat
GPDH _c	cytosolische Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPDH _M	mitochondriale Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathiondimer (oxidierte Form)
GST Ω	Glutathion-S-Transferase Ω
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
Km	Kilometer
km ²	Quadratkilometer
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Metabolom	Gesamtheit der Metaboliten einer Zelle
Metabolomik	Erfassung der Gesamtheit aller Metabolite einer Probe
mM	millimolar
MPT-Pore	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i> (Proteinkomplex der inneren Mitochondrienmembran, der Moleküle bis 1500 Da passieren lässt)
mRNA	„messenger RNA“ (RNA-Transkripte der DNA, die als Bauplan für Proteine dienen)

MS Medium	Medium nach Murashige-Skoog [2]
NAD(P) ⁺ (oxidiert) bzw. NAD(P)H ⁺ + H ⁺ (reduzierte Form)	Nicotinamidadeninucleotid(-phosphat)
NIP-Proteinen	<i>nodulin26-like intrinsic proteins</i>
O [•] , O ₂ [•]	Sauerstoffradikale
Pc	Phytochelatin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PGK	Phosphoglyceratkinase
Pht	Phosphattransporter
PIP	<i>plasma membrane intrinsic protein</i> (zu den Aquaporinen gehörende Familie von Membranproteinen)
Ppm	<i>parts per million</i> („Teile von einer Million“)
Präprobe	der beigemischte arsenbehandelte Pflanzenanteil einer der reziproken Proben (behandelter Teil einer Probe mit einem anderen Stickstoffisotop als Referenz)
Proteom	Gesamtheit der Proteine einer Zelle
Proteomik	Erfassung und Untersuchung der Gesamtheit aller Proteine einer Probe
PTP	mitochondriale Phosphattransporter
qPCR	quantitative PCR
R ²	Bestimmtheitsmaß
Referenz	die beigemischte interne unbehandelte Kontrolle einer der reziproken Proben (unbehandelter Teil einer Probe mit einem anderen Stickstoffisotop als die Präprobe)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROL	Radialer Sauerstoffverlust in der Wurzel (<i>radial oxygen loss</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, z.B. H ₂ O ₂ oder O ₂ ⁻ (<i>reactive oxygen species</i>)
SILAC	<i>stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture</i> (Markieren von Proteinen durch Aminosäuren, deren Stickstoffatome durch ¹⁵ N-Isotope ausgetauscht wurden)
SOD	Superoxiddismutase
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i> (Wachstumsfaktor TGF-β)
THX _(ox)	Thioredoxin (oxidierte Form)
THX _(red)	Thioredoxin (reduzierte Form)
TPX	Thioredoxinperoxidase
TR	Thioredoxinreduktase
Transkriptom	Gesamtheit der RNA-Transkripte einer Zelle
Transkriptomik	Erfassung der Gesamtheit aller mRNA-Transkripte einer Probe
VDAC	<i>volt dependent anion channel</i> (spannungsabhängiger Anionenkanal)
z.B.	zum Beispiel

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Kontamination von Grundwasser und Mutterboden durch Arsenverbindungen in Staaten wie Bangladesch, Indien, Vietnam, aber auch China oder den USA rückt immer mehr ins Bewusstsein. Studien zeigen, dass die Aufnahme von Arsenverbindungen in Pflanzen ein ernstzunehmendes Problem darstellt [3-6]. Daher sollten Wege gefunden werden, um die Aufnahme von Arsen in Pflanzen, die als Nahrungs- bzw. Futtermittel dienen, zu reduzieren oder gänzlich zu verhindern. Nur so können gesundheitliche Langzeitfolgen für die Konsumenten vermieden oder zumindest abgeschwächt werden [7]. Dazu ist es erforderlich, die Aufnahme- und Verteilungsvorgänge zu ermitteln sowie die Auswirkungen dieses Metalloids auf die Pflanze zu verstehen.

Um die hier bestehenden erheblichen Wissenslücken zu schließen, wurden viele Untersuchungen durchgeführt, die sich mit den Bodenbedingungen und deren Einfluss auf die Aufnahme von Arsenverbindungen in Pflanzen beschäftigen. Einen weiteren Schwerpunkt in der Forschung stellen die daran beteiligten Transportproteine dar [3, 8, 9]. Diesen Untersuchungen verdanken wir ein besseres Verständnis sowohl der komplexen Vorgänge, die die Aufnahme der verschiedenen Arsenverbindungen betreffen, als auch der diversen mikrobiologischen Prozesse im Boden. Bodenbedingungen und Mikroorganismen spielen eine entscheidende Rolle für die Löslichkeit und damit die Verfügbarkeit von Mineralien für die Pflanzen [9].

Bisher setzen sich jedoch wenige Untersuchungen mit der molekularen Regulation in der Pflanze auseinander, auch wenn die Tendenz zu solchen Studien stark steigend ist. Untersuchungen des Transkriptoms zeigen schon sehr frühzeitig eine klare Änderung bei verschiedenen Pflanzenarten unter Arsenstress. Im Gegensatz dazu ist das Proteom arsenbehandelter Pflanzen wenig untersucht. Untersuchungen des Proteoms würden einerseits die Transkriptomdaten stützen und andererseits Hinweise auf zusätzliche Regulationsmechanismen auf Proteinebene geben. Dies ist besonders wichtig, da Änderungen im Transkriptom nicht zwangsläufig in Änderungen des Proteoms resultieren [10]. In der vorgelegten Arbeit kam *metabolic labeling* mit anschließender quantitativer Proteomik zur Anwendung, zusammen mit der Beobachtung von arseninduzierten phänotypischen Veränderungen. Die dadurch gewonnenen Daten wurden mit publizierten Daten aus Proteom-, Metabolom- und Transkriptom-Studien verglichen [11-16], um dadurch ein besseres Verständnis der durch Arsen ausgelösten Mechanismen in der Pflanze zu erlangen.

Die quantitativen Untersuchungen des Proteoms zeigten Änderungen in der Menge an Proteinen bei Prozessen wie der Atmungskette, der Glykolyse, epigenetischen Veränderungen, Schwefel-, Redox- und Aminosäurestoffwechsel oder dem Citratzyklus

oder bei Enzymen, die diese Stoffwechselwege miteinander verbinden. Dies deutet einen Effekt von Arsenat auf den Energiehaushalt an. Neben einer erhöhten Menge an Produkten der Aminosäuresynthese konnten auch Änderungen von Metaboliten des Redox- und Schwefelstoffwechsels durch vergleichend gemessene Metabolitenanalysen bestätigt werden. Weitere Prozesse, bei denen sich zumindest partielle Veränderungen in Metabolom und Proteom zeigen, sind der Fett-, Hormon- und der Sekundärstoffwechsel. Durch den Vergleich von Langzeit- und Kurzzeitbehandlung und durch das Trennen der Wurzel- und Sprossgewebe ergab sich ein detailliertes Bild der Veränderungen im Proteom. Die Änderungen in den Wurzeln sind z. B. drastischer und vielzähliger als im Spross, was sich auch anhand der unterschiedlich starken Wachstumsreduktion dieser Organe zeigt. Durch den Vergleich der Daten dieser Arbeit mit den in der Literatur verfügbaren Daten aus Studien des Transkriptoms konnte eine Vielzahl dieser Funde bestätigt werden. Einige der in ihrer Abundanz variierenden Proteine sind allerdings in keiner dieser Studien aufgeführt. Daher sind diese Proteomanalysen, in denen eine große Zahl verändert regulierter Proteine identifiziert wurde, ein wichtiger Schritt, um die Abläufe bei einer Arsenintoxikation von Reis besser zu verstehen.

1.2 English Summary

Soil and ground water in many countries are critically contaminated by arsenic. The countries most concerned with this issue are South-Asian countries like Bangladesh, India or Vietnam, but also China and the US.

It has been shown that the intake of arsenic into plants is a serious issue [3-6]. Consequently, methods have to be established to prevent - or at least impair - the uptake of arsenic into plants that serve as food or will be used as animal fodder in stock breeding. Like this, health issues due to chronic arsenic intoxication could be avoided or significantly attenuated [7]. For this task it is most important to gain a deeper understanding of the uptake and distribution of arsenic in plants and to investigate the effects that arsenic has got on the plant's metabolism. Many studies have examined the soil qualities' impact on the uptake of arsenic into plants. Another topic of great interest has been the role of several transport proteins [3, 8, 9]. Thus we have gained a better understanding of the complex processes around arsenic uptake and the influence of microbes and soil quality. Soil quality and microbic activity have significant impact on the solubility and thus the accessibility of minerals for plants [9].

So far, not much research has been done on the molecular responses to arsenic and the regulation in the plant, even if researchers' interest in that topic has lately been strongly increasing. Examinations of the transcriptome have shown that several plant species show very early responses to arsenic intoxication. In opposition to that, the proteome of arsenic-treated plants has hardly been subject to investigations. Thus, examinations of the proteome could support the transcriptomic data that have been obtained so far, and reveal

additional mechanisms of regulation such as posttranslational modifications. It has been shown that changes in the transcriptome do not necessarily lead to changes in protein composition. In this work metabolic labeling followed by quantitative proteomics is performed, as well as the measurements and observation of physiological changes in arsenic treated rice plants. The comparison of the obtained data with published proteome, metabolome and transcriptome data [11-16] resulted in a better understanding of changes in the rice plants which arsenic can induce. The quantitative proteomics approach revealed changes in abundance of proteins that can be linked to epigenetic changes, sulfur, amino acid and redox metabolism, the oxidative phosphorylation, glycolysis and the tricarboxylic acid cycle as well as enzymes that link these pathways. This implies an effect of arsenic on the energy metabolism. Furthermore, by comparative metabolomics measurements, an elevated level of amino acid metabolites as well as changes in metabolites linked to redox and sulfur pathways were confirmed also. Other processes where the proteomic approach showed partial changes in protein abundance were fat, hormone and secondary metabolism. The long-term and short-term exposure and separation of root and shoot led to a very detailed picture of the changes in the proteome after arsenic exposure. Changes in rice roots are far more drastic than in the shoots, which could also be confirmed by the arsenic-induced difference of growth reduction in these two organs. The comparison of the proteome data with available publications with the same topic [15], which were mainly transcriptome studies, showed a lot of proteins where the direction of the protein regulation was confirmed. But there are also a lot of the proteins, which in this work are shown to be different in abundance after the exposure to arsenic, that were never shown before. Therefore this proteomics analysis and the identification of a huge number of proteins which are changed in abundance are an important step to better understand the changes and differences in rice plants after an arsenic intoxication.

2. EINLEITUNG

2.1 Problematik: Arsenbelastung von Reispflanzen

Arsen und seine toxischen Effekte werden von der Menschheit seit langem genutzt und gefürchtet. Lange Zeit war es ausschließlich die Gefahr der akuten Vergiftung, die den Menschen bewusst war. In den letzten Jahrzehnten wurden die chronische Vergiftung mit kleinen Mengen an Arsen und ihre Folgen immer präsenter und folglich als Bedrohung erkannt. Die Industrialisierung in Bergbau und Landwirtschaft hat zu einer erhöhten Umweltkontamination mit Arsen geführt. Große landwirtschaftlich genutzte Flächen in Bangladesch (118 849 km²) und in Indien (38 865 km²) [17] sowie ehemalige Baumwollfelder in den USA sind mit Arsen belastet [18]. Aber auch in Europa, Südamerika und in asiatischen Ländern wie China, Taiwan, Thailand und Vietnam ist eine Kontamination von Trinkwasser und Böden durch Arsen zu beobachten.

Kontaminationen sind dem Einsatz von arsenhaltigen Insektiziden oder Herbiziden sowie der Aktivierung von erhöhten natürlichen Vorkommen in der Erde geschuldet. In Bangladesch waren Fehler bei humanitären Projekten der Grund. Da die Trinkwassersituation in Bangladesch durch Kontamination mit Krankheitserregern nicht länger tragbar war, wurden Brunnen gebohrt, um die Bevölkerung mit Grundwasser zu versorgen [19, 20]. Der Verzicht auf vorherige Boden- und Wasseranalysen führte zu einer der größten Massenvergiftungen der Menschheitsgeschichte [20]. Dieses arsenbelastete Wasser wurde und wird weiterhin nicht nur als Trinkwasser, sondern auch für Ackerbau und Viehzucht verwendet, und führt dadurch zu einer erhöhten Arsenbelastung der Böden [5, 21]. Der Anbau von Reis auf belasteten Flächen führt wiederum zu einer erneuten Intoxikation beim Menschen, da gerade Reis Arsen in bedenklichen Mengen aufnehmen kann [3]. Allein in Bangladesch waren im Jahr 2002 bei 38 000 Menschen arsenabhängige gesundheitliche Folgen zu beklagen [21]. Bis zu 80 Mio. Menschen sind weiterhin erhöhten Arsenkonzentrationen ausgesetzt [22]. In Studien konnte belegt werden, dass eine chronische Vergiftung mit geringen Mengen Arsen karzinogene, neurotoxische und nephrotoxische Wirkung zeigt sowie *Diabetes mellitus* auslösen kann [7, 23]. Studien, die den Ursprung der Arsenquelle für die Vergiftung untersucht haben, zeigen, dass 44-55% des Arsens von den Menschen in den betroffenen Gebieten über Reis aufgenommen wird [24].

Aber nicht nur in den direkt betroffenen Gebieten können die Auswirkungen der Arsenbelastung beobachtet werden, auch in Reisprodukten in Europa werden erhöhte Arsenkonzentrationen festgestellt, wie z.B. eine Studie der Zeitschrift *Ökotest* (Juni 2012) zu Reiswaffeln zeigt. Hier wurden Konzentrationen von über 200 µg/kg gemessen, was für einen gesunden Erwachsenen, dessen Ernährung abwechslungsreich gestaltet ist,

eventuell noch kein Problem darstellt, aber für Kleinkinder durchaus bedenklich ist. Es gibt bislang wenige Ansätze, diesem Problem zu begegnen.

Es wird versucht, mit kostengünstigen Filtersystemen [25, 26] das Wasser zu entgiften, was *in puncto* Trinkwasserversorgung sicherlich einen sehr guten Lösungsansatz darstellt. Für die enormen Mengen Wasser, die zur Bewässerung der Felder notwendig sind, erscheint diese Lösung allerdings nicht praktikabel. Des Weiteren bleibt auch das Problem der bereits kontaminierten Muttererde bestehen. Um diese zu entgiften, gibt es Modelle für hyperakkumulierende Pflanzen, die dann abgeerntet und entsorgt werden könnten und so eine Entgiftung des Erdreichs ermöglichen würden. Probleme bei diesem Ansatz sind die Ertragsausfälle bei den Bauern, was dieses Modell in armen Regionen sicherlich nicht praktikabel erscheinen lässt. Da schon die Kontamination der Böden mit Arsen den Ertrag senkt, ist den Bauern das teilweise Brachlegen ihrer Felder zur Arsenentgiftung kaum zumutbar. Weiterhin stellt sich die Frage, wie die geernteten Hyperakkumulierer flächendeckend sicher entsorgt werden können, ehe sie eventuell doch wieder z.B. als Viehfutter oder zur Düngung verwendet würden und somit das Arsen wieder freigesetzt würde.

Ein weiterer Lösungsansatz ist das Minimieren bzw. das Verhindern der Arsenaufnahme in die Pflanzen. Zwar wird hierbei das Problem der vergifteten Böden nicht grundsätzlich gelöst. Dennoch würde es helfen, die Lebensqualität und Sicherheit der betroffenen Bevölkerung zu erhöhen.

Um hyperakkumulierende Pflanzen bzw. Pflanzen mit verminderter Arsenaufnahme zu züchten oder mittels gentechnischer Verfahren zu modifizieren, ist es zunächst einmal notwendig, die genauen Mechanismen der Aufnahme und des Transportes des Arsens in der Reispflanze zu verstehen. Zu dieser wichtigen Aufgabe leistet die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag.

2.2 Phänotypen im Zusammenhang mit Arsenintoxikationen

Arsenverbindungen haben nicht auf alle Pflanzen den gleichen Effekt. Sogar innerhalb der Gattung *Oryza* gibt es sortenspezifische Variationen, was die Sensitivität gegenüber Arsen angeht [3]. Auch gibt es durchaus Unterschiede zwischen den verschiedenen anorganischen und organischen Arsenspezies und deren Effekten [27].

In Kooperation mit den Geoökologen der Eberhard Karls Universität Tübingen wurde die Reissorte *Oryza sativa* L. cv. Gladia näher auf ihre Resistenz und Arsenaufnahme untersucht [28]. Diese Untersuchungen sind in der Veröffentlichung mit dem Titel "*Are rice (Oryza sativa L.) phosphate transporters regulated similarly by phosphate and arsenate? A comprehensive study*" publiziert. Diese Sorte zeigt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Arsen. Die Experimente zeigen zwar wenig Einfluss von Arsen auf die Keimungsrate bei bis zu 50 μ M Arsenat. Beim Wachstum der Pflanzen sind aber schon frühzeitig und bei

geringen Konzentrationen (ab 13 μM) Veränderungen beim Wurzellängenwachstum und der Sprosslänge zu beobachten. Tatsächlich zeigten Messungen mittels ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) nach einer einwöchigen Behandlung Arsenkonzentrationen in der Wurzel, die beinahe 10fach höher lagen als im Spross [28]. Da Arsen über die Wurzeln aufgenommen und gleich in den Stoffwechsel eingeschleust wird, gelangt es nur bei hyperakkumulierenden Pflanzen, die Arsen aktiv über die Pflanze verteilen, auch in größeren Mengen in die Blätter [29]. Im Normalfall jedoch hat Arsen den größten Effekt auf die Wurzeln. Das spiegelt sich auch in den Messungen zur Bestimmung der Wachstumsreduktion wieder. Denn nicht nur die Arsenkonzentration in den Wurzeln war wesentlich höher im Vergleich zum Spross, auch die Wachstumsreduktion der Wurzeln ist stärker als die der Sprosse [28]. Der Effekt auf das Wurzelwachstum war – unabhängig von der dem Medium zugegebenen Arsenkonzentration – immer größer als der auf das Sprosswachstum.

Im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen haben arsenbehandelte Pflanzen eine deutlich veränderte Wurzelmorphologie: Die Anzahl und Länge der Lateralwurzeln ist wesentlich geringer als bei der Kontrolle. Außerdem konnte in jedem Versuch eine Veränderung der Wurzelfarbe festgestellt werden. Die einzigen beiden bis *dato* bekannten Gründe bei Reispflanzen für eine Verfärbung der Wurzeln sind sogenannte Eisen-Plaques und das Wachstum unter anoxischen Bedingungen [30, 31].

Eisen-Plaques an sich sind in Verbindung mit Arsen untersucht worden. Es hat sich gezeigt, dass Pflanzen mit Eisen-Plaques an den Wurzeln weniger Arsen aufnehmen [32]. Wahrscheinlich bilden Eisen-Plaques eine Art Barriere für Ionen wie Arsenat. Für die Entstehung von Eisen-Plaques ist meist der sogenannte radiale Sauerstoffverlust (ROL) der Wurzeln verantwortlich. In Reis wird durch Aerenchyma Luft in die Wurzeln transportiert, um bei sauerstoffarmen Bedingungen die Wurzeln mit Sauerstoff zu versorgen. Tritt Sauerstoff aus der Wurzel in die Rhizosphäre aus, wird das gelöste Eisen in der Umgebung der Wurzel oxidiert. Das oxidierte Eisen lagert sich entlang der Wurzel an und bildet auf diese Weise in der Rhizosphäre die Eisen-Plaques [33].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Bedingungen zu diesen Verfärbungen führen und welchen Ursprung sie haben.

2.3 Arsenaufnahme und toxische Effekte

Viele Böden rund um die Welt sind mit organischen und anorganischen Arsenverbindungen verunreinigt. Organische Arsenverbindungen sind häufig methylierte Arsenverbindungen wie Monomethylarsonsäure (MMA(V)), Monomethylarsinsäure (MMA(III)) oder Dimethylarsonsäure (DMA(V)) bzw. Dimethylarsinsäure (DMA(III)) [18]. Sie leiten sich vom Arsenit (trivalent, As(III)) bzw. vom Arsenat (pentavalent, As(V)) ab.

Bei Säugetieren entstehen diese Verbindungen im Zuge der Entgiftungsprozesse von Arsen. Pflanzen sind zwar in der Lage, diese Verbindungen aufzunehmen und zu reduzieren, scheinen selbst aber nicht befähigt zu sein, Arsensalze zu methylieren. Man geht folglich davon aus, dass in Pflanzen gefundene methylierte Arsenverbindungen von Mikroorganismen im Boden gebildet und dann von den Pflanzen über die Wurzeln aufgenommen wurden [34].

Der Redoxzustand der anorganischen Arsenverbindungen ist von pH-Wert, Sauerstoffgehalt und der Zusammensetzung der Mineralien im Boden abhängig sowie von der allgemeinen Beschaffenheit des Bodens. Diese Bedingungen und die Mikroflora haben großen Einfluss auf die Aufnahme von Arsenverbindungen in die Pflanze [35]. Die Pflanze selbst wiederum beeinflusst sowohl Bodenbeschaffenheit als auch Mikroflora in ihrer näheren Umgebung. Die Wechselwirkung dieser anorganischen Parameter, der Mikroflora und der Pflanze sind ein komplexes System, das im Moment Schwerpunkt einiger Studien ist [36].

Arsenit (trivalent, As(III)) scheint unter anoxischen Bedingungen die überwiegende Form darzustellen, in der Arsen vorkommt. Diese anoxischen Bedingungen sind beim Nassreisanbau (auf den überfluteten Feldern) oft gegeben.

Die Aufnahme von Arsenit in die Pflanze erfolgt mittels Transportern der Aquaporin-Proteinfamilie, die das Anion durch die Plasmamembran transportieren [37]. Arsenit wird unter anderem durch Siliziumtransporter wie OsNIP2;1 transportiert. OsNIP2;1 gehört zu den NIP-Proteinen (*nodulin26-like intrinsic proteins*), welche wiederum den Aquaporinen zugeordnet werden. Eine Mutation in diesem Transporter führte zu einer Reduktion der Arsenitaufnahme um 60 % [3]. Dies zeigt die enge Verwandtschaft von Kieselsäure (o-Kieselsäure; $\text{Si}(\text{OH})_4$) und Arsenit, die beide ähnlich groß sind. Es hat sich gezeigt, dass Silizium wachstums- und entwicklungsfördernd wirkt und bei der Pathogenabwehr und Stressantwort positive Effekte hat. Gerade Gräser wie Reis scheinen größere Mengen Silizium aufzunehmen [38]. Da Arsenit aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit durch dieselben Transporter in die Pflanze gelangen kann, reichern Reispflanzen diese Form von Arsen besonders leicht an [39-41]. Später wurden auch andere Aquaporine identifiziert, die Arsenit transportieren können, z.B. in der PIP-Familie (*plasma membrane intrinsic protein*) [37].

Arsenat (pentavalent, As(V)) hingegen ist die überwiegende Form beim Trockenanbau [19]. Die Aufnahme von Arsenat erfolgt mittels hochaffiner Phosphattransporter (Pht, Abb. 1). Die chemischen Eigenschaften von Arsenat und Phosphat sind sehr ähnlich. Das zeigt sich u.a. anhand der zahlreichen Nachweismethoden, bei denen beide Ionen gleich reagieren [42]. So ist das Arsenat-Ion ähnlich dem Phosphat-Ion tetraedrisch aufgebaut und beide lassen sich vom Säuretyp H_3RO_4 ableiten. Das Zentralion hat in beiden Fällen eine Oxidationszahl von V, die durch Reduktion zu III wechseln kann [43]. Dies führt dazu, dass die Ionen sich insgesamt auch in biologischen Systemen und bei der Aufnahme in die Pflanze sehr ähnlich verhalten [3, 44, 45]. Lange wurde aufgrund dieser Tatsache angenommen, dass keine Unterschiede bestehen, die die konzentrationsabhängige

Regulation der Transporter für diese Ionen betreffen. Durch eine umfangreiche qPCR-Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass die Phosphattransporter sowohl in der Wurzel als auch im Spross von Arsenat und Phosphat in einigen Fällen unterschiedlich reguliert werden [28].

Aufgrund der ähnlichen Struktur von Arsenat und Phosphat wird vermutet, dass die toxischen Eigenschaften des Arsenats darauf beruhen, dass in einigen Reaktionen Phosphat durch Arsenat ersetzt wird. Da die Arsenverbindungen meist instabiler sind oder nicht funktional, könnten diese Bereiche des Energiehaushalts negativ beeinflusst werden. Diese Annahmen werden durch einige *in vitro* Experimente mit Enzymen aus Säugetieren unterstützt, die Arsenat als Substrat verwenden können [46]. So zeigen *in vitro* Versuche die Möglichkeit auf, dass durch ATPasen anstelle von ATP ADP-Arsenat gebildet wird. Dieses ist wesentlich instabiler als ATP und somit nicht in der Lage, die übertragene Energie zu speichern und weiterzugeben. Stattdessen zerfällt es in kurzer Zeit und das Arsenat steht erneut als Substrat für diese ungewollte Reaktion zur Verfügung. Dieser Vorgang wird Arsenolyse genannt. Auch andere Enzyme verwenden Arsenat/Arsenatverbindungen anstelle von Phosphat/Phosphatverbindungen und erzielen in der Folge die entsprechend kurzlebigen Produkte. Zu diesen Enzymen gehören Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels wie die Hexokinase und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) [46-49]. Ob sich diese experimentellen Ergebnisse von tierischen Systemen direkt auf Pflanzen übertragen lassen, ist natürlich schwer zu beurteilen.

Nach der Aufnahme durch die Phosphattransporter in die Zelle wird ein großer Teil des Arsenats zu Arsenit reduziert [44]. Für diese Redoxreaktion wurden einige Enzyme schon als potentielle Arsenat-Reduktasen identifiziert, darunter neben GAPDH in Ratten z.B. auch eine CDC25-homologe Tyrosinkinase mit Phosphataseaktivität aus Reis und eine Purin-Nukleosid-Phosphorylase in Säugerzellen [50-52].

Arsenit hat in der Zelle einige schädliche bis letale Eigenschaften, wie z.B. die Tendenz, mit Sulfhydryl-Gruppen von Proteinen oder mit anderen Thiolverbindungen zu reagieren. Auf diese Weise wird die Funktion oder die Aktivität dieser Moleküle beeinträchtigt. Insbesondere das Binden von Arsenit an SH-Gruppen im aktiven Zentrum eines Enzyms führt zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms und damit ggf. zum Verlust wichtiger metabolischer oder entgiftender Funktionen [53].

2.4 Entgiftungsstoffwechsel der Pflanze bei Arsenintoxikation

Einige Studien deuten darauf hin, dass das Arsenit, das entweder als solches aufgenommen wurde oder in der Pflanze aus der Reduktion von Arsenat entstanden ist, mit Thiolverbindungen wie Glutathion und Phytochelatin komplexiert wird. Anschließend werden diese mithilfe von ABC-Transportern in die Vakuole transportiert [3, 44]. Die

Lokalisierung von Arsen auf subzellulärer Ebene hat den Transport von Arsenverbindungen in die Vakuole bestätigt [54]. Auch zellbiologische Analysen und Untersuchungen des Transkriptom unterstützen das oben beschriebene Modell als Entgiftungsmechanismus [13] (Abb. 1). Wie in Abbildung 1 gezeigt, erklärt der hier dargestellte Entgiftungsmechanismus einige der beobachteten Veränderungen in Aminosäurestoffwechsel und Schwefelmetabolismus. Außerdem lässt sich mittels der Elektronendonatoren Glutathion (GSH) und Nicotinamidadenindinukleotid ($\text{NADH}+\text{H}^+$), eventuell eine Verbindung zu oxidativem Stress knüpfen. So liegt nahe, dass es durch den erhöhten Bedarf an Antioxidantien wie GSH zu einer Verschiebung im Redoxhaushalt kommt. Bei Mangel an Elektronendonatoren wie $\text{NADH}+\text{H}^+$ und GSH können die natürlich vorkommenden Nebenprodukte der Elektronentransportketten wie z.B. H_2O_2 nicht mehr entgiftet werden und reichern sich an. Dies würde dann zu oxidativem Stress führen und als Reaktion darauf wiederum zu einer entsprechenden transkriptionellen und metabolischen Umstrukturierung.

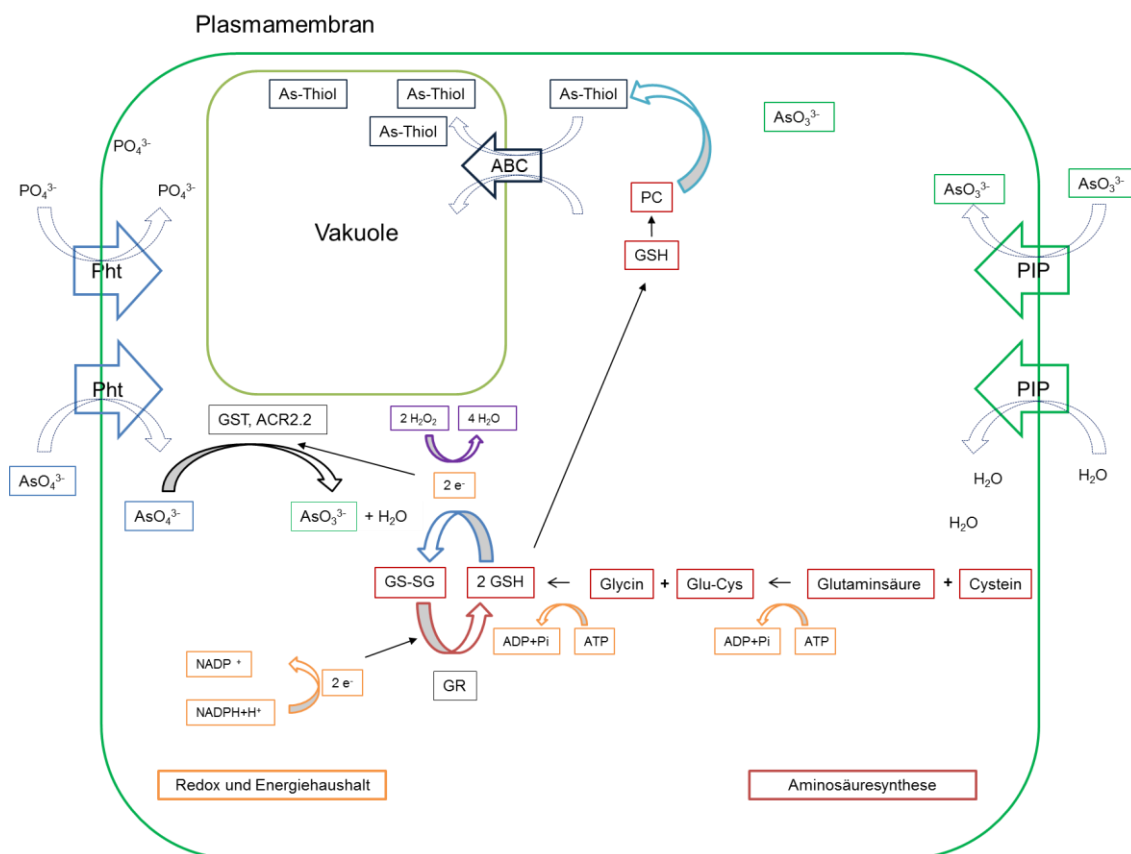


Abbildung 1: Schema zur zellulären Entgiftung von Arsen

Dargestellt ist eine Pflanzenzelle mit den bislang aufgeklärten Transport- und Entgiftungsmechanismen für Arsenverbindungen. Die Pfeile rechts und links symbolisieren Transportproteine, die Arsenverbindungen ins Cytosol transportieren.

Pht bezeichnet eine Familie hochaffiner Phosphattransporter, die auch Arsenat mit hoher Effizienz aufnehmen können. PIPs gehören zu den Aquaporinen, sie ermöglichen die Aufnahme von im Wasser gelöstem Arsenit. →

Im Zellinnern wird Arsenat (AsO_4^{3-}) durch die Arsenat-Reduktase ACR2.2 zu Arsenit (AsO_3^{3-}) reduziert. Die Glutathion-S-Transferasen der Ω -Klasse (GSTO) reduzieren in Humanzellen organische Arsenat-Verbindungen [55]. Für Pflanzen ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar. Als Kandidat für diese Aufgabe werden λ -GSTs der Pflanzen diskutiert, die strukturelle Ähnlichkeiten mit GSTO haben [56]. Die benötigten Elektronen und Protonen werden von zwei Molekülen Glutathion (GSH) zur Verfügung gestellt. Das oxidierte Glutathion-Dimer (GS-SG) wird im Anschluss von der Glutathion-Reduktase (GR) mit $\text{NADPH}+\text{H}^+$ als Elektronendonator wieder reduziert. Eine weitere Funktion nimmt das Glutathion zumeist indirekt bei der Bekämpfung von ROS (z.B. H_2O_2) ein.

Arsenit konjugiert sehr wahrscheinlich an die Thiolgruppe der Cysteine und führt zusammen mit Phytochelatinen (PC) zu einer Thiol-Arsenverbindung (As-Thiol), die mittels ABC-Transportern in die Vakuole transportiert wird [57].

2.5 Glutathion, der Aufbau und die Aufgaben

Da sowohl bei der Entgiftung von Arsenverbindungen als auch später beim oxidativen Stress (einer mittelbaren Folge von Arsenstress) Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle spielt, soll hier kurz auf das Molekül eingegangen werden.

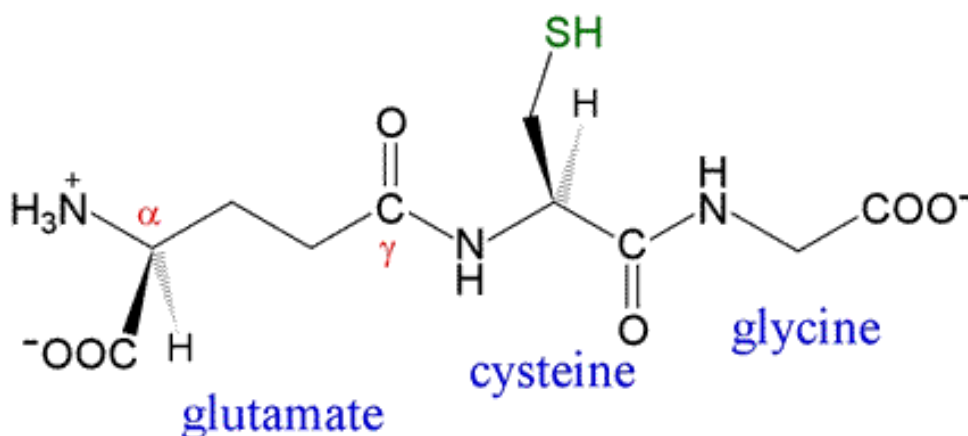


Abbildung 2: Aufbau von Glutathion

Glutathionmolekül mit Säureamidbindung an der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure und Peptidbindung zwischen Cystein und Glycin. Zur Oxidation von Glutathion müssen zwei Glutathionmoleküle zusammen kommen. Hierbei bilden die Cysteine zwischen den beiden Molekülen unter Abgabe von zwei Protonen und zwei Elektronen eine Schwefelbrücke aus.

Glutathion ist ein Molekül, das aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht. Die Carboxylgruppe des Cysteins ist mittels Peptidbindung mit der Aminogruppe des Glycins verknüpft. Die Verbindung zwischen Cystein und Glutaminsäure besteht aber über die γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure, so dass diese Säureamidbindung eine atypische Peptidbindung darstellt [58] (Abb. 2).

Aufgrund der Thiolgruppe des Cysteins können bei oxidativem Stress unter Bildung von Disulfidbrücken Glutathion-Dimere gebildet werden (GS-SG). Glutathion ist durch diese Fähigkeit ein idealer Elektronendonator für eine ganze Reihe von Redoxreaktionen (Abb. 3). Thiole unterscheiden sich von Alkoholen durch die große, polarisierbare Elektronenhülle des Schwefels, durch die sie nicht nur als Elektronendonator, sondern auch als so genannte weiche Nukleophile dienen. Sie können damit gleichermaßen reaktive Sauerstoffspezies und weiche Elektrophile entschärfen.

Die Glutathion-Synthese ist mit der Aminosäuresynthese, aufgrund des Cysteingehalts mit dem Schwefelstoffwechsel und durch den ATP-Verbrauch mit dem Energiestoffwechsel der Zelle verknüpft.

Glutathion spielt aber nicht nur bei der Vermeidung von oxidativem Stress eine Rolle, sondern auch allgemein bei Entgiftungsvorgängen. Es dient als Grundbaustein für die Synthese so genannter Phytochelatine – das sind Makromoleküle, die für die verschiedensten Entgiftungsprozesse essenziell sind [59].

Bei der Phytochelatin-Synthese wird vom Glutathion zunächst das Glycin abgespalten und das Cystein des ersten Glutathions wird via Peptidbindung mit der Glutaminsäure des zweiten Glutathions verknüpft. Auf diese Weise können beliebig lange Phytochelatin-Moleküle entstehen. Die Phytochelatine dienen dann als Chelatoren von organischen oder anorganischen Molekülen mit toxischer Wirkung [59, 60]. Durch das Binden werden diese Toxine vorläufig unschädlich gemacht.

Die Konjugation von Arsenit an Phytochelatine ist somit ein weiterer möglicher Grund für Änderungen im Energie-, Schwefel- und Aminosäurehaushalt (Abb. 1). Dies sind somit indirekte Effekte des Arsenstresses, die zu einem gestörten Gleichgewicht im Organismus führen und ausgeglichen werden müssen. Zu diesen Nebeneffekten, die in der Summe bis zum Absterben der Pflanze führen können, gehört auch oxidativer Stress. Oxidativer Stress entsteht durch eine Erhöhung der Konzentration von ROS-Molekülen (reaktive Sauerstoffspezies) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Sauerstoffradikale ($O\bullet$, $O_2\bullet$). Die Pflanze muss also erhebliche Änderungen in ihrem Stoffwechsel und ihrem Energiehaushalt durchführen, um der Verschiebung des Redoxgleichgewichts entgegenzuwirken. Diese Änderungen sind notwendig, um die eventuell durch ROS beschädigten Proteine, DNA-Abschnitte und Lipide zu reparieren oder zu ersetzen, dem erhöhten Verbrauch an Glutathion gerecht zu werden sowie die für diese Vorgänge notwendige Energie bereitzustellen. Durch das Einstellen anderer Synthesevorgänge kann Energie eingespart werden. Diese Einsparung an Energie geht eventuell zu Lasten von Wachstum, Blütenbildung oder der Fruchtentwicklung [27].

2.6 Auslöser und Entstehungsorte von oxidativem Stress

Die Auslöser für oxidativen Stress sind mannigfaltig und komplex. Dabei zeigen die effektiven und zahlreichen Mechanismen, die zum Abbau radikaler Sauerstoffspezies angelegt sind, dass die Konzentration dieser Radikale genau reguliert werden muss. Die Entstehung von ROS ist auch unter stressfreien Bedingungen gegeben. In bestimmten Situationen wird ihre Produktion sogar gezielt katalysiert, z.B. in der Pathogenabwehr, als Signalmoleküle oder zur Lignifizierung. Für die Entstehung von ROS als ungewollte Nebenprodukte sind im Allgemeinen die Elektronentransportketten und die damit verknüpften Redoxreaktionen verantwortlich. Im Speziellen sind das die Photosysteme in der Photosynthese sowie die Komplexe I, II und III der Atmungskette und an Redoxreaktionen beteiligte Enzyme des Citratzyklus' [61]. Auch die Peroxisomen und die darin enthaltenen Enzyme tragen zur Synthese von ROS-Molekülen bei. Dasselbe gilt für einige Peroxidasen und Oxygenasen in der Zellwand und im Zytoplasma, darunter die große Familie der Cytochrom P₄₅₀-Enzyme [59].

Die toxische Wirkung dieser ROS-Moleküle – Inaktivierung oder Modifikation lebenswichtiger (Makro-)Moleküle – wird durch verschiedene Mechanismen in Schach gehalten. Zum einen muss ein Übermaß an ROS umgehend abgebaut werden, zum anderen ist es nicht minder wichtig, die Bildung weiterer ROS-Moleküle zu verhindern. Daher werden Prozesse wie Photosynthese und Atmung unter anderem durch Schlüsselenzyme stark reguliert. Dadurch wird neben der direkten toxischen Wirkung der ROS insbesondere die negative Auswirkung auf den Energiehaushalt vermieden, der bei oxidativem Stress durch die energieaufwendige Entgiftung stark belastet wird [62].

2.7 Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet man Ionen oder hochreaktive Radikale des Sauerstoffs oder niedermolekularer sauerstoffhaltiger Verbindungen. Diese können spontan durch Zerfall größerer Moleküle, durch UV-Strahlung oder im Zuge von Stoffwechselfvorgängen entstehen. Besonders radikalische und elektrophile Moleküle stellen eine Gefahr für lebende Zellen dar, da sie wahllos mit anderen Molekülen reagieren, dabei z.B. Lipidmembranen angreifen, sich an Nukleinsäuren oder Proteine addieren und dadurch z.B. die Struktur der DNA verändern oder Enzyme inaktivieren. Zellen verfügen daher über ausgeklügelte Abwehrmechanismen, um sich gegen ROS zu schützen [63].

Wenn Sauerstoffradikale in der Zelle entstehen, werden diese zunächst durch die Superoxiddismutase (SOD) auf Wasser übertragen. Auf diese Weise wird das stabilere H₂O₂ gebildet. H₂O₂ wird mittels verschiedener Peroxidasen unter direktem oder indirektem Verbrauch von NAD(P)H+H⁺ zu Wasser reduziert. Eine zentrale Komponente

bei der ROS-Entgiftung ist Glutathion [64]. Zwei Moleküle seiner reduzierten Form GSH können unter Ausbildung einer Schwefelbrücke zwischen den Cysteinen zwei Elektronen und zwei Protonen an einen Akzeptor abgeben. Dabei entsteht das oxidierte Glutathiondimer (GS-SG). Durch die Qualität als Elektronendonator ist Glutathion bei mannigfaltigen Redoxreaktionen beteiligt. Zu diesen gehören die durch Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysierten Entgiftungsvorgänge[65]. Auch die Glutathionperoxidase (GPX), die ein Hauptelement bei der Wasserstoffperoxid-Entgiftung darstellt, bezieht die zur Reduktion des H_2O_2 s nötigen Elektronen von Glutathion.

Einige Studien zeigen, dass GSTs aus den Klassen Φ und T zusätzlich Glutathionperoxidaseaktivität haben [56, 65, 66]. Dies bedeutet, dass die erhöhte Expression dieser Gene in mit Arsen behandelten Pflanzen nicht unbedingt ausschließlich mit der Arsenentgiftung zu tun haben muss. Hier ist eine genaue Differenzierung der verschiedenen GSTs und ihrer Aufgaben unerlässlich.

Das oxidierte Glutathiondimer (GS-SG) kann durch die Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ wieder in die reduzierte Form überführt werden (Abb. 1).

Glutathion spielt also eine ganz zentrale Rolle bei der Entgiftung von Arsen: Es ist der Elektronendonator für die Reduktion von Arsenat und fungiert in Form von Phytochelatin als Konjugationspartner für Arsenit. Auch beim Bekämpfen der sekundären Effekte ist es von essenzieller Bedeutung, da es der Neutralisierung von ROS ebenso dient wie als Cofaktor für die entgiftenden Redoxreaktionen.

Ein weiteres wichtiges Enzym zur Reduktion von H_2O_2 ist die Ascorbat-Peroxidase (APX). Die Elektronen werden durch die Oxidation von Ascorbat (ASC) zu Dehydroascorbat (ASC_{ox}) zur Verfügung gestellt. Zur Reduktion von Dehydroascorbat/Semidehydroascorbat, also zur Regenerierung der Ascorbinsäure, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Während Thioredoxin, $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ oder GSH das Semidehydroascorbat direkt reduzieren können, ist für die Reduktion von Dehydroascorbat die Dehydroascorbatreduktase (DSHR) oder zumindest bei Tieren eine Glutathion-S-Transferase der Ω -Familie (GSTO) verantwortlich [55].

Die vorwiegend in den Peroxisomen lokalisierte Katalase unterstützt eine Reaktion von zwei Wasserstoffperoxidmolekülen zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Diese Reaktion benötigt also keinen zusätzlichen Elektronendonator. Aufgrund der weitestgehend auf die Peroxisomen beschränkten Lokalisierung der Katalase ist diese Reaktion allerdings im Cytosol und in den Chloroplasten nicht möglich.

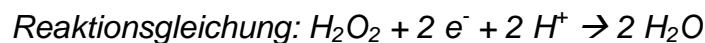
Ein weiterer Elektronendonator zur ROS-Entgiftung ist Thioredoxin (TRX_{red}). Die Thioredoxinperoxidase (TPX) katalysiert die Reduktion von H_2O_2 unter Oxidation von THX_{red} . Regeneriert werden kann Thioredoxin (THX_{ox}) durch die Thioredoxinreduktase (TR), die $\text{NADPH}+\text{H}^+$ als Elektronendonator verwendet [63] (Abb. 3).

Die Verfügbarkeit von $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ ist – direkt oder indirekt – für alle in der Zelle ablaufenden Redoxreaktionen von größter Bedeutung. Dieser Elektronendonator wird in

verschiedenen Schritten der Glykolyse, der β -Oxidation, der Photosynthese oder des Citratzyklus' gebildet. Das sind neben der Atmungskette und einigen weiteren Enzymen die natürlichen Quellen von ROS. Das Herunterregulieren derjenigen Stoffwechselwege, die eine ohnehin schon bestehende ROS-Belastung noch vergrößern würden, führt somit schlussendlich zu einem Engpass an den für die Entgiftung unerlässlichlichen Reduktionsäquivalenten.

NAD(P)H+H⁺ lässt sich nicht nur zur Entgiftung verwenden, sondern ist auch für die Atmungskette unerlässlich, da es die Aufgabe erfüllt, durch den Transport von Elektronen einen Protonengradienten aufzubauen. Dieser Protonengradient ist eine der wichtigsten Energieressourcen der Zelle; ATPasen gewinnen daraus die Energie, die sie zur Phosphorylierung von ADP benötigen.

Die genaue Art und Weise, wie es bei Arsenstress zu oxidativem Stress kommt, ist ungeklärt. Eine Erklärungsmöglichkeit für die vermehrte Anreicherung von ROS ist das Ausschöpfen der Kapazität an Antioxidantien. Bei Metallvergiftungen werden üblicherweise große Mengen an Antioxidantien zur Entgiftung benötigt. Da Metallionen chelatiert werden, ist jedes verwendete Molekül dauerhaft gebunden und wird dem Wiederverwendungskreislauf entzogen. Antioxidantien sind Moleküle wie Glutathion oder Ascorbat (ASC). Sie können oxidiert werden und liefern die Elektronen und die Protonen, die bei der Reaktion von H₂O₂ zu Wasser benötigt werden.



Antioxidantien

Somit kann bei Metallvergiftungen der natürliche Vorrat erschöpft werden. Das führt dann dazu, dass die als ungewollte Nebenprodukte des Stoffwechsels oder anderweitig anfallenden ROS nicht mehr vollständig entgiftet werden können [67].

Nicht nur auf transkriptioneller Ebene [11, 13], sondern auch in Proteomik-Studien konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Glutathion-S-Transferasen unter Arsenstress stark angekurbelt wird [15]. Dies kann als ein Hinweis auf die Bindung von Glutathion an Arsen gewertet werden. Die Auslöser oder Regulatoren dieser und anderer Arsen-induzierter Vorgänge sind aber dennoch weitgehend unbekannt.

Eine andere Möglichkeit erklärt sich mithilfe eines Energiedefizits. Durch den Energiemangel unter Zugzwang gesetzt, kompensiert der Organismus den erhöhten Bedarf, indem Systeme wie z.B. die Atmungskette und β -Oxidation mehr leisten müssen. Dadurch werden als Nebenprodukte zwangsläufig auch mehr ROS-Moleküle gebildet. Außerdem ist die energieaufwendige Entgiftung bei Energiemangel nicht mehr vollständig möglich.

Möglicherweise tragen auch beide theoretisch möglichen Szenarien zu dem beobachteten ROS-Stress bei.

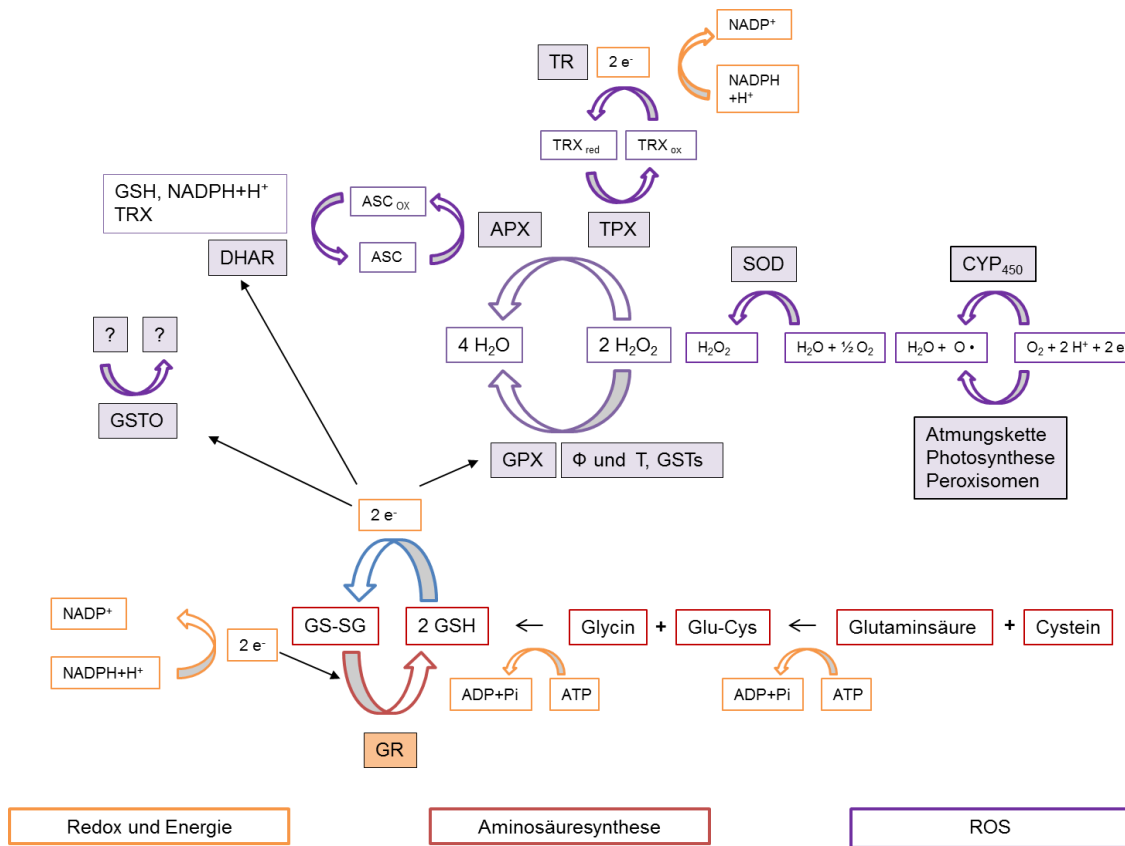


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies

Gezeigt sind verschiedene Entgiftungsmechanismen zur Regulation von ROS.

In der Mitte rechts sind einige der Prozesse aufgeführt, die zur Entstehung von ROS beitragen. Mittels der Superoxiddismutase (SOD) werden die Radikale in das relativ stabile H_2O_2 umgesetzt. H_2O_2 kann im Zuge der drei hier dargestellten Redoxreaktionen durch Reduktion zu Wasser entgiftet werden. Oben rechts ist die Entgiftung mittels Thioredoxin (TRX_{red}) dargestellt, oben links die Reduktion von H_2O_2 durch die Ascorbat-Peroxidase (APX). Anschließend an die Reaktion der APX eröffnet sich die Möglichkeit, H_2O_2 durch die Glutathionperoxidase (GPX) oder Glutathion-S-Transferasen (GST) unschädlich zu machen.

2.8 Atmungskette und die Kopplung von Citratzyklus und Glykolyse

Arsenat weist eine ähnliche Struktur auf wie Phosphat, daher wird vermutet, dass es auch in den gleichen Prozessen als Substrat dienen könnte. Es wäre also zunächst eine reduzierte Umsatzrate von Phosphat in diesen Prozessen zu erwarten. Die Atmungskette – nicht zu unrecht auch oxidative Phosphorylierung genannt – bietet somit einen möglichen Angriffspunkt für Arsenat im pflanzlichen Metabolismus.

Die Atmungskette dient als Akzeptor für Elektronen aus den verschiedensten zellulären Reaktionen und transportiert diese Elektronen von Komplex zu Komplex, um am Ende Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren. Die Energie dieser „schrittweise ablaufenden Knallgasreaktion“ wird graduell dafür verwendet, einen Protonengradienten zwischen Matrixraum und Intermembranraum aufzubauen. Die Komplexe I, III und IV pumpen dafür bei der Übertragung der Elektronen Protonen von der Matrix in den Intermembranraum. Dieser Protonengradient wird dann von ATPasen zur Synthese von ATP verwendet.

Als Elektronendonator für diesen Elektronentransport gibt es verschiedene Substrate. Der wichtigste Donor ist $\text{NADH}+\text{H}^+$, welches bei Reaktionen im Citratzyklus gewonnen wird oder durch die Reduktion von NAD^+ in der mitochondrialen Matrix entsteht. Die Elektronen für diese Reduktion werden durch das Malat-Aspartat-Shuttle über die Membran transportiert und von Reaktionen im Zytosol bereitgestellt. Eine weitere direkte Verbindung zwischen Citratzyklus und Atmungskette stellt der Komplex II (die Succinat-Dehydrogenase) dar: Die frei werdenden Elektronen bei der Reaktion von Succinat zu Fumarat werden direkt in die Atmungskette weitergegeben. Allerdings kann die Atmungskette auch ohne Komplex II ablaufen, wie in Abbildung 4 unten dargestellt ist. Komplex II steuert nichts zum Aufbau des Protonengradienten bei und ist dadurch zwar eine wichtige Elektronenquelle, scheint jedoch für den Ablauf der Atmungskette nicht essenziell zu sein.

Die nächste Möglichkeit, Elektronen in die Atmungskette einzuspeisen, ist das Glycerin-3-Phosphat-Shuttle, welches Elektronen von der Glykolyse auf Ubichinon überträgt. Darüberhinaus können auch Metabolite wie Pyruvat und Acetyl-CoA aus der Glykolyse oder der β -Oxidation in den Citratzyklus eingespeist werden und auf diese Weise die Atmungskette antreiben [58, 68]. Um diese lebenswichtigen Mechanismen zu steuern und – wie oben schon erwähnt – die damit verknüpfte ROS-Produktion in Grenzen zu halten, gibt es stark regulierte Schlüsselproteine [69]. Ein solches stark reguliertes Enzym ist z.B. die Succinat-Dehydrogenase, das Bindeglied von Atmungskette und Citratzyklus. Die Succinat-Dehydrogenase wird durch Malat und Oxalacetat inhibiert, also durch Produkte des Citratzyklus'. Eine Studie an Mitochondrien aus Mäusemuskulgewebe gibt Hinweise auf den Grund der Inhibition durch Produkte des Citratzyklus': Stockt die Versorgung des Citratzyklus mit Acetyl-CoA – und damit die Produktion von Reduktionsäquivalenten durch den Citratzyklus – reichert sich Oxalacetat an. Da Oxalacetat durch den letzten Schritt des Citratzyklus' mit Malat im Gleichgewicht steht, gilt dasselbe auch für Malat, so dass beide Moleküle, die die Succinat-Dehydrogenase hemmen, in erhöhten Konzentrationen vorliegen. Durch das Stocken des Citratzyklus' kann der Komplex I der Atmungskette nicht ausreichend mit $\text{NADH}+\text{H}^+$ versorgt werden. Durch das Ausbleiben des $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Nachschubs ist es möglich, dass auch die Atmungskette ins Stocken gerät und die Elektronen sogar von der Succinat-Dehydrogenase zu Komplex I zurückfließen. Würde nun die Succinat-Dehydrogenase nicht gehemmt, so bliebe sie weiter aktiv und das verbleibende Substrat würde weiter umgesetzt. Auf diese Weise würden Elektronen in die Atmungskette abgegeben und flössenen entgegen der eigentlichen Richtung der Atmungskette zu Komplex I zurück.

Es konnte auch gezeigt werden, dass es durch den von der Succinat-Dehydrogenase induzierten Elektronenrückfluss zu einer erhöhten Produktion von Superoxid kommt [70]. Die Autoren vermuten daher, dass die Hemmung der Succinat-Dehydrogenase unter anderem die Abgabe von Elektronen an die Atmungskette verhindern soll, solange Komplex I nicht mit $\text{NADH}+\text{H}^+$ versorgt wird. Auf diese Weise wird ein Rückfluss von Elektronen von Komplex II auf Komplex I und damit die ROS-Produktion verhindert.

Die Inhibierung der Succinat-Dehydrogenase durch Oxalacetat kann also die ROS-Produktion von Komplex I reduzieren [61]. Dies wäre abgesehen von der grundsätzlichen Notwendigkeit, wichtige Prozesse wie die Energieversorgung fein abstimmen zu können, ein weiterer wichtiger Grund für die Regulation der Succinat-Dehydrogenase. Zusätzliche bekannte Möglichkeiten, dieses Enzym zu beeinflussen, sind Acetylasen und Deacetylasen sowie eine transkriptionelle Regulation.

Ein weiteres beteiligtes und stark reguliertes Enzym ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat über $\text{NADH}+\text{H}^+$ Elektronen zur Verfügung stellt. Die Elektronen werden dann über das Glycerin-3-Phosphat-Shuttle in die Atmungskette eingeleitet. Die GAPDH stellt damit eine Verknüpfung zwischen der Glykolyse und der Atmungskette dar. Die nächste Reaktion der Glykolyse ist die Oxidation des neu gewonnenen 1,3-Bisphosphoglycerats (Abb. 4).

Die Enzymaktivität der GAPDH wird dabei unter anderem substratabhängig gesteuert. Durch das Umsetzen von Phosphat, das in den meisten Fällen nur durch die Umsetzung von ATP frei wird, ist die GAPDH somit ein indirekter Sensor für den Energiebedarf. Die GAPDH ist auch transkriptionell und posttranskriptionell reguliert. Bei der posttranskriptionellen Regulation handelt es sich um eine Redoxmodifikation eines katalytisch aktiven Cysteins. Diese Modifikation verhindert also, dass die GAPDH weiter enzymatisch aktiv ist. Durch die Modifikation ändert die GAPDH aber sehr wahrscheinlich auch in Pflanzen die zelluläre Lokalisation [71]. In tierischen Systemen wurden diese als "*moonlighting*" bezeichneten Eigenschaften der GAPDH, also Eigenschaften eines Enzyms, die nichts mit der enzymatischen Aktivität zu tun haben, sondern oftmals regulatorischer Natur sind, weiter untersucht. Es zeigte sich der Einfluss der GAPDH auf die Apoptose, auf die Biosynthese von Histonen sowie auf die DNA-Stabilität, die Expression von Androgen-Rezeptoren und vieles mehr [72]. Auch wenn die Untersuchung dieser zusätzlichen Funktionen von Enzymen wie der GAPDH noch ganz am Anfang steht, ist doch schon klar, dass diese als wichtige Signalmoleküle die Schnittstelle zwischen dem Metabolismus und seiner Regulation darstellen können.

Die weitere Verknüpfung der Glykolyse mit der Atmungskette ist das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat. Die Pyruvat-Dehydrogenase setzt Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO_2 um und reduziert dabei NAD^+ . Acetyl-CoA wiederum wird in den Citratzyklus eingespeist. Die Umsetzung durch den Citratzyklus liefert dann die Energie und die Elektronen für die Atmung.

Störungen im Energiemetabolismus, in der Atmungskette und im Citratzyklus wurden bei Arsenatstress zwar schon länger vermutet, waren aber bislang meist nur durch Enzymkinetiken mit homologen Enzymen aus verschiedenen Spezies belegt [27].

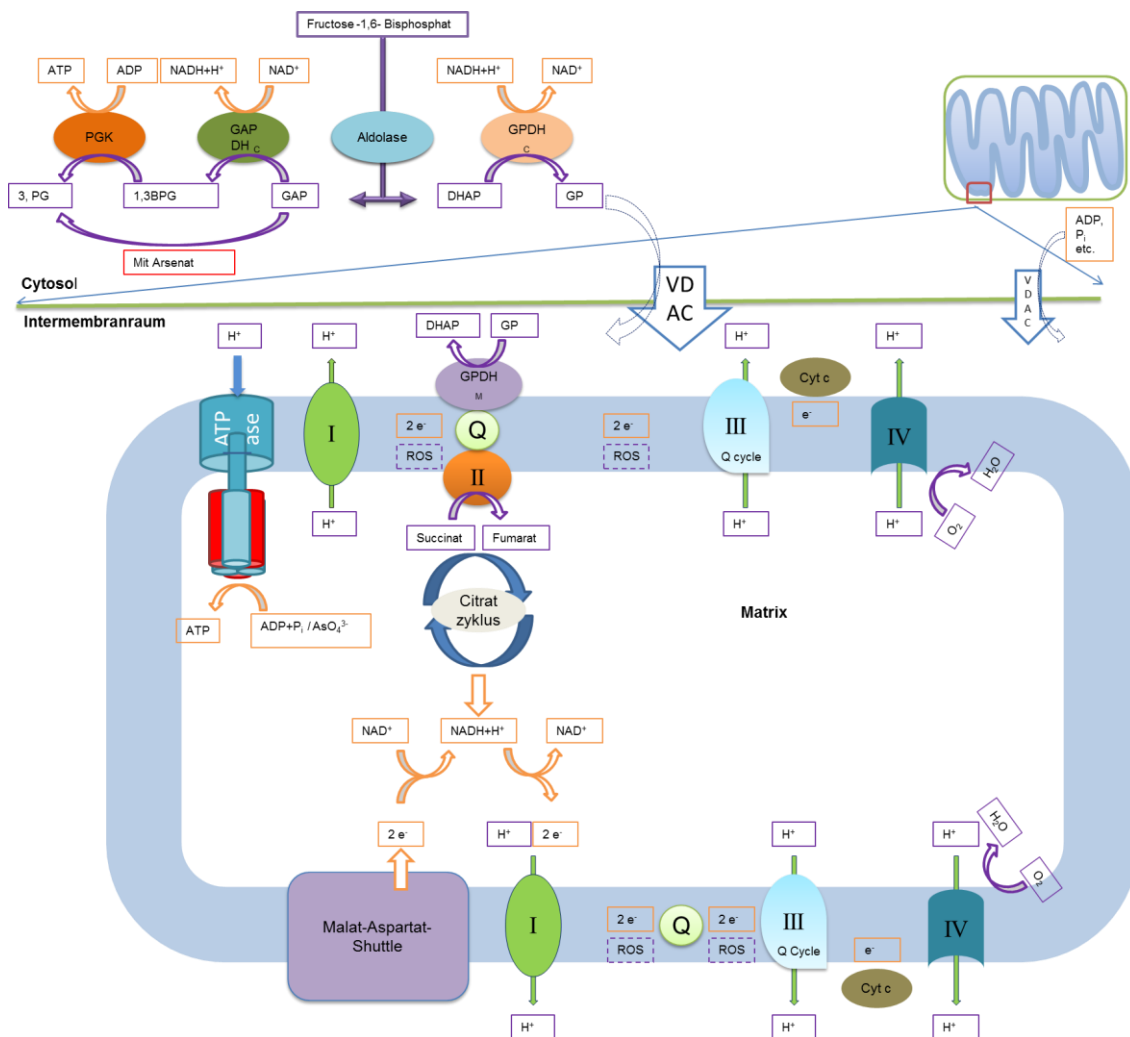


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Atmungskette und der Kopplung von Citratzyklus und Glykolyse

Darstellung ausgewählter Abläufe an der Membran eines pflanzlichen Mitochondriums. Bei dem hier abgebildeten Mitochondrium wurde ein Abschnitt der Membran vergrößert, um die genauen Abläufe darstellen zu können. Der in der Matrix ablaufende Citratzyklus ist über die Succinat-Dehydrogenase (Teil des Komplex' II) mit der in der inneren Membran lokalisierten Atmungskette verbunden und gibt über die Oxidation von Succinat zu Fumarat Elektronen an die Atmungskette ab. Andere Reaktionen des Citratzyklus' generieren reduziertes Nicotinamadenindinukleotid ($\text{NADH}+\text{H}^+$). $\text{NADH}+\text{H}^+$ kann zur ATP-Gewinnung Elektronen an den Komplex I abgeben. Das Malat-Aspartat-Shuttle bietet dabei die Möglichkeit, Elektronen aus dem Cytoplasma in die Atmungskette einzuspeisen. Die Komplexe I, III und IV transportieren aktiv Protonen über die Membran. Der Q-Zyklus in Komplex III und die Reduktion von einem Zwei-Elektronen-Transport auf einen einfachen Elektronentransport bewirken eine erhöhte Protonentransportrate mittels Ubichinon-10 (Q). Auch an dieser Stelle können Elektronen vom Cytoplasma mittels des sogenannten Glycerin-3-Phosphat-Shuttles in die Atmungskette gebracht werden. Glycerin-3-Phosphat (GP) wird mithilfe eines spannungsabhängigen Anionenkanals (VDAC) durch die Membran

transportiert und kann dann von der mitochondrialen Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgesetzt werden und so zwei Elektronen an das Ubichinon abgeben. Vor dem Transport über die Membran setzt die cytosolische Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zusammen mit dem Elektronendonator $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Glycerin-3-Phosphat um. Das $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht bei der Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 1,3-Bisphospho-Glycerat (1,3-BPG) durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Phosphoglyceratkinase (PGK) setzt das 1,3-Bisphospho-Glycerat um zu 3-Phosphoglycerat. Die dabei frei werdende Energie wird genutzt, um ATP zu gewinnen.

Das Glycerin-3-Phosphat-Shuttle ist somit die Verknüpfung der Glykolyse mit der Atmungskette. Fructose-1,6-Bisphosphat wird durch die Aldolase zu je einem Molekül Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und einem Molekül Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgesetzt.

Der Elektronentransporter zwischen Komplex III und Komplex IV ist Cytochrom c (Cyt c). Cytochrom c kann nur ein Elektron transportieren und ist nicht in der Membran verankert. Am Ende der Elektronentransportkette steht der Komplex IV, der die Elektronen auf Sauerstoff überträgt. Der Sauerstoff reagiert mit den Elektronen und Protonen weiter zu Wasser.

Die Atmungskette ist somit eine Ansammlung von Komplexen, die durch den Transport von Elektronen Protonen durch die Membran aus der Matrix in den Innermembranraum transportiert. Dieser Protonengradient wird von membranständigen ATPasen verwendet, um $\text{ADP} + \text{P}_i$ zu ATP zu phosphorylieren.

2.9 Molekularbiologische Änderungen bei Arsenintoxikation

Bislang ist bekannt, dass Arsen drastische Auswirkungen auf den Redoxstoffwechsel von Pflanzen hat und dass es den Schwefel- und Aminosäurestoffwechsel beeinflusst [27]. Weitere Erkenntnisse über durch Arsen veränderte Stoffwechselmechanismen oder Entgiftungsmechanismen sind kaum vorhanden. Weiterführende Modelle und Annahmen sind – wie die vermuteten Änderungen im Energiestoffwechsel – häufig nur durch *in vitro* Experimente belegt oder basieren auf Ergebnissen von anderen Modellorganismen. Einige dieser Untersuchungen zeigen die Effekte, die Arsen auf diese Enzyme und Stoffwechselwege des Energiehaushalts hat.

An aus menschlichen Leberzellen isolierten Mitochondrien konnten Effekte von Arsen auf die Mitochondrien gezeigt werden. Unter anderem sind Effekte wie eine Verringerung des Membranpotentials, niedrigere Aktivität von Komplex II und die Freisetzung von Cytochrom c in das Plasma beobachtet worden. Wie zu vermuten war, zeigten die Mitochondrien auch eine erhöhte ROS-Produktion, die durch die Arsenvergiftung ausgelöst wurde [73] (Abb. 5). Die niedrigere Aktivität der Succinat-Dehydrogenase ist also zusätzlich zu dem allgemeinen Einfluss von Arsenat auf die Mitochondrien beobachtet worden und beeinflusst damit die Elektronenabgabe der Succinat-Dehydrogenase an die Atmungskette.

Weitere Versuche in Säugern haben gezeigt, dass die GAPDH auch Arsenat anstelle von Phosphat verwenden kann. Im Gegensatz zu 1,3-Bisphosphoglycerat ist 1-Arsenato-3-Phospho-D-Glycerat allerdings nicht sehr stabil und auch nicht energiereich genug, um für

die Phosphorylierung von ADP durch die Phosphoglyceratkinase verwendet zu werden. Es zerfällt also umgehend in das energieärmere 3-Phosphoglycerat. Dies bedeutet einen Verlust an Energie in diesem Schritt der Glykolyse [46, 48] (Abb. 5).

Die Pyruvat-Dehydrogenase ist in Studien als möglicher Angriffspunkt für Arsentoxizität identifiziert worden. So zeigen *Arabidopsis*-Pflanzen mit Mutationen in Genen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes erhöhte Arsensensitivität [74]. Diese Entkopplung von Glykolyse und Citratzyklus wäre ein entscheidender Mechanismus, um die Toxizität von Arsen zu erklären. Aus diesem möglichen Einfluss von Arsen auf diese Schlüsselenzyme würde sich eine Modifikation und eventuell eine Leistungsabnahme im Energiehaushalt ergeben, die die Auslöser für einige der phänotypischen Veränderungen erklären könnten, darunter das reduzierte Wachstum und den verminderten Ertrag.

Wie schon erwähnt, wurde bei *in vitro* Versuchen der Prozess der Arsenolyse auch für das von ATPasen hergestellte ADP-Arsenat gezeigt. Die Synthese von ATP stellt eine weitere Reaktion dar, die den Energiehaushalt unmittelbar betrifft.

In der Veröffentlichung von Michael J. Gresse [49] werden auch Hexokinasen und die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als Enzyme identifiziert, die organische Arsenatverbindungen umsetzen können. Um nachzuweisen, dass mitochondriale Partikel mit den Substraten ADP und Arsenat ADP-Arsenat produzieren können, wurde folgender Versuch durchgeführt:

Zu den mitochondrialen Partikeln wurden Arsenat, Succinat und ADP gegeben, das erwartete Produkt (ADP-Arsenat) aus dieser Reaktion ist aber nur schwer messbar. Daher wurden dem gleichen Ansatz eine Hexokinase und Glucose beigegeben. Die Hexokinase katalysiert eigentlich die Phosphorylierung von Hexosen zu Phosphohexosen, indem das Phosphat von ATP auf die Hexose übertragen wird. Mit ADP-Arsenat wurde sehr wahrscheinlich das Arsenat auf die Glucose übertragen und Glucose-6-Arsenat gebildet. Um das zu überprüfen, wurde dem Ansatz neben NADP^+ ein weiteres Enzym hinzugefügt, die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase. Dieses Enzym setzt Glucose-6-Phosphat um zu 6-Phosphogluconolacton und reduziert dabei NADP^+ . Das Ziel war also, durch die Zugabe von Hexokinase und ihrem Substrat sowie der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase NADP^+ zu reduzieren und photometrisch zu bestimmen. Als Kontrolle wurden die gleichen Ansätze auch mit Phosphat anstelle von Arsenat durchgeführt.

Im Versuch von Gresse konnte auch nach der Zugabe von Arsenat eine Verschiebung des $\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$ Verhältnis photometrisch bestimmt werden. Damit konnte ein Nachweis für die Bildung von ADP-Arsenat erbracht werden. Es konnte auf diese Weise aber auch gezeigt werden, dass zumindest *in vitro* sowohl die Hexokinase als auch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase Arsenatverbindungen umsetzen können (Abb. 5).

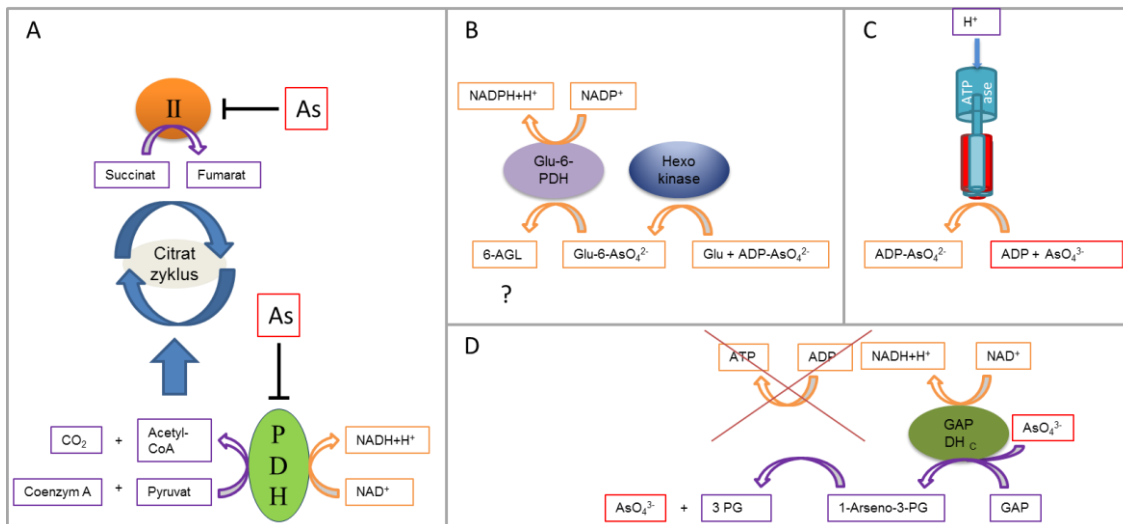


Abbildung 5: Arsen als Hemmstoff oder Phosphat analog im Stoffwechsel

A: Darstellung der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II der Atmungskette) und der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), die beide durch Arsenit gehemmt werden können. Dies hat direkte Auswirkungen auf die Versorgung des Citratzyklus mit Acetyl-CoA und die Versorgung der Atmungskette mit Elektronen.

B: Wenn ADP-Arsenat (ADP-AsO_4^{2-}) zur Verfügung gestellt wird, kann die Hexokinase die Reaktion von Arsenat und Glucose zu Glucose-6-Arsenat (Glu-6-AsO_4^{2-}) katalysieren. Dieses kann dann sehr wahrscheinlich von der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glu-6-PDH) als Substrat verwendet werden und daher NADP^+ reduzieren. Das Produkt der Glu-6-PDH wäre folglich das 6-Arsenogluconolacton (6-AGL). Allerdings wurden diese Zwischenprodukte nicht direkt bestimmt oder identifiziert (vgl. Text).

C: Es konnte indirekt gezeigt werden, dass ATPasen auch Arsenat als Substrat akzeptieren und anstelle von ATP das Endprodukt ADP-Arsenat entsteht.

D: Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kann anstelle von Phosphat auch Arsenat mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) verestern, so dass 1-Arseno-3-Phospho-D-Glycerat (1-Arseno-3-PG) entsteht. Dieses ist allerdings zu instabil, so dass es zu 3-Phosphoglycerat und Arsenat zerfällt, ohne dass die Energie aus der Bindung zur Synthese von ATP verwendet werden könnte.

All diese Erkenntnisse können natürlich nicht ohne weitere Nachforschungen unmittelbar auf Pflanzen übertragen werden. Dennoch bieten sie einen gewissen Einblick in die Veränderungen des zellulären Metabolismus, die eine Arsenintoxikation bewirken kann.

Zur Untersuchung eines so globalen Phänomens wie einer Arsenvergiftung stellen momentan Transkriptom-Studien die beste Informationsquelle dar. Sie zeigen weitere möglicherweise arsenbedingte Veränderungen in der Expression von Genen auf, die in ganz unterschiedliche Richtungen weisen. Zu nennen sind Änderungen der Genexpression in inter- und intrazellulärem Transport, Phosphatstoffwechsel, Sekundärstoffwechsel, Photosynthese, Zuckermetabolismus, in der Hormon- und Stressantwort sowie im Lipidstoffwechsel [11-14]. Diese Ergebnisse stellen eine gute Grundlage dar und geben Denkanstöße für weitere Forschung, dennoch führen sie nicht

zu einem detaillierten Verständnis der Regulation und der genaueren Abläufe, da die Vorgänge auf Proteinebene ungeklärt bleiben.

Eine weitere wichtige und schwere Aufgabe ist die Differenzierung zwischen primären Effekten und Folgeeffekten. Außerdem ist weitgehend unbekannt, ob die im Transkriptom beobachteten Änderungen auch Einfluss auf Protein- und Metabolom-Ebene haben.

Besonders wenig ist bekannt über die regulatorischen Mechanismen auf Proteinebene. Dies könnte das Bild weiter komplettieren, indem Mechanismen dargestellt werden, die nicht über das Transkriptom aufgelöst werden können. Leider sind bis heute nur wenige Proteomuntersuchungen bekannt.

2.10 Vergleich von verschiedenen Methoden zur Untersuchung des Proteoms

Proteomuntersuchungen und die dazugehörige Methodik haben in den letzten Jahren eine enorme Entwicklung vollzogen. Die Schwierigkeit einer Proteomuntersuchung besteht in der großen Anzahl an Proteinen und ihrer unterschiedlichen Quantität. Da Proteine nicht wie DNA *in vitro* vervielfältigt werden können, beruht die Messung ausschließlich auf der isolierten Proteinmenge. Daher ist es ohne spezielle Anreicherung nicht möglich, Proteine unterhalb des Detektionsminimums zu quantifizieren.

Des Weiteren kann die unterschiedliche Quantität der Proteine dazu führen, dass schwach exprimierte Proteine durch stark exprimierte Proteine bei der massenspektrometrischen Messung maskiert werden. Daher ist das Auftrennen der Proteine von großer Bedeutung.

Eine der am weitesten verbreiteten Methoden hierfür ist das 2D-Protein-Gel. Durch das Vergleichen mehrerer Gele lassen sich hierbei die einzelnen Proteine außerdem quantifizieren. Diese weitverbreitete „klassische“ Proteomik-Methode über das 2D-Proteingel ist bei Arsen-Intoxikation von Reis bis heute die einzige Herangehensweise bei den Proteomstudien. Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie zum Vergleichen und Quantifizieren sehr vieler Proteine gleichzeitig nicht geeignet bzw. durch inhomogene Gele und Bedingungen sehr aufwendig ist. Methoden wie SILAC oder *label free quantification* würden dieses Problem elegant umgehen, sind aber sehr teuer oder, insbesondere im Fall der *label free quantification*, mit sehr zeitintensiver Auswertung verbunden, so dass Messungen in einer Größenordnung wie in dieser Arbeit in unserem Labor nicht realisierbar gewesen wären. Die Weiterentwicklung von Massenspektrometern und vor allem der dazugehörigen Detektion und Analysemöglichkeiten machen es möglich, eine große Anzahl von Proben und Proteinen gleichzeitig und in kurzer Zeit zu messen. Durch das Markieren der Proteine lassen sich unterschiedliche Proben für die Aufarbeitung mischen und bei der Messung dennoch unterscheiden. In der Gruppe von Prof. Dr. Waltraud Schulze wurden dieses so genannte *metabolic labeling* von *Arabidopsis*-

Pflanzen und daran angepasste Methoden zur Quantifizierung und weiteren Auswertung etabliert [75, 76].

Die Methode der Wahl ist daher *metabolic labeling* [76]. *Metabolic labeling* basiert auf der Verwendung stabiler Isotope zur Markierung pflanzlicher Metabolite und Proteine. In diesem Fall wird das stabile Stickstoffisotop ^{15}N der Pflanze über Stickstoffsalze im Nährmedium zugeführt. Dadurch können alle Proteine gleichzeitig und in gleichem Maße markiert werden. Markierte und nicht-markierte Proben können dann gemischt und als eine einzige Probe prozessiert werden. Bei der Messung ist aufgrund des Massenunterschieds durch das ^{15}N dennoch eine Differenzierung der beiden Proben möglich. Mit einer nicht-markierten Kontrolle als internem Standard können auf diese Weise Änderungen von Proteinkonzentrationen festgestellt werden. Der Vorteil hierbei ist also eine interne Referenz, die nicht durch separate Behandlung während der Probenaufarbeitung verfälscht werden kann. Dadurch werden die Sensibilität der Methode und die Aussagekraft der Ergebnisse erheblich verbessert, da auch kleine Änderungen als solche erkannt werden können und nicht als technisch bedingte Schwankungen abgetan werden müssen. Freilich handelt es sich bei dieser Methode nur um eine relative und nicht um eine absolute Quantifizierung, was zur Betrachtung der Änderungen im Zuge einer Arsenbehandlung aber vollkommen ausreichend ist.

3. ZIELSETZUNG

Aufgrund von Untersuchungen, die sich mit den Wechselwirkungen zwischen Boden und Mikroorganismen beschäftigen, sowie einiger Untersuchungen bezüglich der Aufnahme von Arsenspezies in Pflanzen konnten einige der wichtigen Mechanismen in diesem komplexen Zusammenspiel ermittelt werden. Weniger bekannt sind die Veränderungen des Stoffwechsels und die Anpassung an Arsenstress innerhalb der Pflanze. Insbesondere die Veränderungen und Mechanismen auf Proteinebene sind weitgehend ungeklärt. Bei zahlreichen Vorgängen in der Pflanze sind Substratmengen oder Proteinmodifikationen wichtige regulatorische Elemente, die auf Transkriptomebene nicht erfasst werden. Gerade im Energiestoffwechsel, der Atmung, dem Citratzyklus und dem Zuckermetabolismus ist eine strenge und schnelle Regulation notwendig, die auf Proteom-Basis besser detektierbar sein dürfte. Die Daten aus den Proteomstudien sollen die Ergebnisse aus Transkriptom-Studien verifizieren und das Bild durch weitere Mechanismen ergänzen.

- I. Aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur von Arsenat und Phosphat wird vermutet, dass Enzyme Arsenat anstelle von Phosphat als Substrat annehmen. Dies würde zu einer kompetitiven Hemmung führen und hätte somit Effekte auf den Energiehaushalt bzw. die oxidative Phosphorylierung. Die meisten Untersuchungen zu diesem Thema wurden an tierischen Systemen durchgeführt, eine Bestätigung der Ergebnisse im physiologischen Kontext einer Pflanze steht bislang aus.

Durch die Morphologie-, Metabolom- und Proteomanalyse soll ein besseres Verständnis dieser Vorgänge erlangt und überprüft werden, inwieweit sich diese bislang vor anderem Hintergrund gezeigten Mechanismen auf Reispflanzen übertragen lassen.

- II. Transkriptomuntersuchungen haben schon bei Kurzzeit-Behandlungen mit Arsenat mannigfaltige Änderungen in der Genexpression gezeigt. Eine Bestätigung, dass diese auch Einfluss auf die Proteinexpression haben, ist wünschenswert, stand bislang aber noch aus. Besonders interessant sollten Änderungen des Proteoms sein, die sich anhand von Transkriptomdaten nicht erwarten ließen. Darüber hinaus sollen auch die Mechanismen, die zu diesen bekannten Änderungen führen, durch Messungen des Proteoms nach relativ kurzer Arsenintoxikation bestimmt werden.

Um die Chancen zu erhöhen, regulatorische Proteine zu quantifizieren, sollen Zellkerne und Mitochondrien angereichert werden und es soll eine relative Quantifizierungsmethode mittels ^{15}N etabliert werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material, Geräte, Software und Datenbanken

4.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumnitrat (¹⁵ N)	Euriso-Top Saarbrücken, D
Ammoniumnitrat	Merck, Darmstadt, D
Blei(II)-chlorid	Merck, Darmstadt, D
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Genaxxon, Biberach, D
Cadmiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Calciumchlorid, wasserfrei	Merck, Darmstadt, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Coomassie Brillantblau R-250	Serva, Heidelberg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eisen (komplexiert mit EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
Harnstoff	Merck, Darmstadt, D
Jodacetamid	Merck, Darmstadt, D

Isopropanol	Fluka, Buchs, CH
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat, di-	Merck, Darmstadt, D
Kaliumhydroxid	Roth, Karlsruhe, D
Kupfer(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe, D
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt, D
Manganchlorid	Merck, Darmstadt, D
MES (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Methanol	Fisher Scientific, Schwerte, D
Murashige-Skoog Medium (MS)	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenarsenat	Merck, Darmstadt, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phloroglucin	Roth, Karlsruhe, D
Phytoagar	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
Protease Inhibitor (Complete Protease Inhibitor Cocktail)	Roche, Mannheim, D
Rinderalbumin (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Saccharose	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure 37%	J.T. Baker, Deventer, NL
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt, D

Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween 20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt, D
Zinksulfat	Merck, Darmstadt, D

4.1.2 Enzyme

Cellulase	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
DNase	Roth, Karlsruhe, D
Macerozym	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
RNAse	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin	Promega, Mannheim, D

4.1.3 Geräte

HPLC	Proxeon Easy-LC system
LTQ-Orbitrap-XL	Thermo Fisher Scientific, D
Mikroplatten-Reader	Tecan Safire
Nanoelectrospray-Einheit	Proxeon Biosystems, DN
Pipetten	Eppendorf Research
Rotor: JA-14	Beckman (USA)
Säule <i>reversed-phase</i> ReproSil-Pur C18-AQ 3- μ m <i>resin</i>	Dr. Maisch GmbH
Schütteltisch	Labor Shaker Adolf Kühner AG (CH)

Sterilbänke	BSB4A von Gelaire Flow Laboratories
Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer 5436
Vortex	Mixer UZZIO VTX-3000L von Eppendorf 5417R
Zentrifuge	Beckman (USA)
Zentrifuge Induction Drive Centrifuge Model J2-21M	

4.1.4 Programme

Endnote	Thomson Reuters EndNote®
JMP	SAS Institute Inc.
Mapman version 3.5.1 R2	Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology GABI Primary Database Am Muehlenberg 1 D-14476 Golm http://mapman.gabipd.org
Microsoft Office Professional 2010	Microsoft Deutschland GmbH
MSQuant	Center for Experimental Bioinformatics (CEBI) at University of Southern Denmark
Windows 7	Microsoft Deutschland GmbH

4.1.5 Datenbanken

NCBI	U.S. National Library of Medicine
UniProt	Protein Information Resource Swiss Institute of

Bioinformatics (SIB)
<http://www.uniprot.org/>

Rap-db	http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/converter/run
Gramene	http://www.gramene.org/pathways
TAIR	http://www.arabidopsis.org/index.jsp

4.1.6 Organismen

Oryza sativa L. Gladia

Oryza sativa L. N 22

4.2 Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für die Analysen der Morphologie und Keimung unter Arseneinfluss

Die Durchführung der Versuche und die Wachstumsbedingungen der Pflanzen zur Untersuchung der Wurzelmorphologie und Sprossmorphologie sowie der Keimung von mit Arsenat behandelten Reispflanzen sind detailliert in der zugehörigen Veröffentlichung beschrieben [28].

4.3 Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für die Untersuchung des Phänotyps

Für die morphologischen Untersuchungen wurden die Pflanzen unter denselben Bedingungen angezogen wie die Pflanzen für die Proteomikanalysen.

Lediglich das hierfür verwendete Hoagland-Medium wurde in diesem Fall ein wenig anders modifiziert. Die Zusammensetzung war:

4 mM KNO₃, 1 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 112 µM Fe-Na-EDTA, 26 µM H₃BO₃, 0,2 µM CuSO₄, 9,2 µM MnCl₂, 0,5 µM Na₂MoO₄, 0,8 µM ZnSO₄. Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 5,7 eingestellt.

In einigen Fällen wurde auch Murashige-Skoog-Medium verwendet. Dieses war dann 1:10 verdünnt und mittels MES (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure) auf einen pH-Wert von 5,7 eingestellt. Verwendet wurde es für die Etzold-, Sudan III- und Ligninfärbung der Pflanzen, die 3 Tage lang Arsen ausgesetzt waren, sowie bei der Aufzucht der Pflanzen, die für die Metabolommessungen verwendet wurden. Alle übrigen Pflanzen wurden in Hoagland-Medium kultiviert.

4.4 Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für die Untersuchung des Proteoms

Karyopsen von *Oryza sativa* L. Gladia wurden auf Agar mit ½ Hoagland_{mod.}-Medium ausgelegt. Um eine frühe Pilz- und Bakterienkontamination zu verhindern, wurden Agar, Medium, die Reaktionsgefäße und die Gefäße für das Flüssigmedium autoklaviert und unter sterilen Bedingungen verwendet. Da es später ein offenes System ist, war die Kultur allerdings nicht dauerhaft steril. Die Reiskaryopsen wurden geschält und dann für 4 Tage im Dunkeln bei 25°C und 65% Luftfeuchtigkeit zum Keimen gebracht. Dafür wurden die Karyopsen soweit in den Agar gesteckt, dass der Embryo nicht austrocknet. Zu diesem Zweck wurden 0,5 ml fassende Reaktionsgefäße unter der Sterilbank mit Agar/Hoaglandmedium_(mod) befüllt. Die Zusammensetzung war wie folgt:

0,5% Phytoagar in ½ Hoagland_{mod.} (4 mM NH₄NO₃ bzw. ¹⁵NH₄¹⁵NO₃, 4 mM KCl 1 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 112 µM Fe-Na-EDTA, 26 µM H₃BO₃, 0,2 µM CuSO₄, 9,2 µM MnCl₂, 0,5 µM Na₂MoO₄, 0,8 µM ZnSO₄). Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 5,7 eingestellt.

Nachdem die Wurzeln den Agar durchwachsen haben, wurden die Reaktionsgefäße unten abgeschnitten und in das Medium ohne Agar (½ Hoagland_{mod.}) gestellt. Es wurden mindestens 24 Pflanzen pro Bedingung verwendet. Eine Arsenbehandlung erfolgte durch Zugabe von Na₂HAsO₄ zu den entsprechenden Proben mit einer Endkonzentration von 25 µM Na₂HAsO₄. Die letzten zwei Wochen musste täglich das verdunstete Wasser mit MilliQ-Wasser nachgefüllt werden.

4.5 Färbemethoden der Wurzeln

Etzold Färbung: Zur näheren Bestimmung der Zellwandkomponenten, die für die unter Arseneinfluss beobachtete Verfärbung verantwortlich sein könnten, wurden diese mit einer Fuchsin-Chrysoidin-Astrablau-Lösung nach Etzold 5 min lang gefärbt. (Zusammensetzung der Etzold-Lösung: 0,1 mg Neufuchsin, 0,143 mg Chrysoidin, 1,25 mg Astrablau, 20 µl Eisessig mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt.) Durch das Färben mit diesem Farbstoffgemisch erscheinen verholzte Zellwände rot und zwar – je nach Grad der Verholzung – oftmals auch in verschiedenen Rottönen. Holzfasern erscheinen dunkelrot und cutinisierte Zellwände gelb bis orangerot. Unverholzte, nicht cutinisierte Zellwände erscheinen blau.

Lignin-Färbung: Zum Nachweis von Lignin wurde das Präparat in eine salzsaure, ethanolische (1-5%) Phloroglucin-Lösung gelegt und nach 30 min mit Wasser auf einem Objektträger mikroskopiert [77]. Gewebe, das Lignin enthält, sollte sich dann rot verfärben.

Sudan-III-Färbung: Die Sudan-III-Färbung wird verwendet, um Fette und Wachse zu färben. Diese erscheinen nach erfolgreicher Färbung hell- bis dunkelrot. Zu diesen wachsartigen Substanzen, die mit Sudan III gefärbt werden können, zählen auch Suberin und Cutin. Für die Färbung wurden 2,5 mg Sudan III in 5 ml Ethanol aufgelöst und anschließend durch einen Papierfilter gefiltert. Diese Lösung wurde mit der gleichen Menge Glycerin gemischt.

Der Schnitt wurde zusammen mit der Färbelösung auf dem Objektträger leicht erwärmt. Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit frischem Glycerin gewaschen und mikroskopiert.

4.6 Messung der Metaboliten

Die Proben für die Metabolomuntersuchungen wurden nach demselben Schema angesetzt wie die Langzeitbehandlung in der Veröffentlichung Mühe, E.M., et al [28]. Die drei Wochen alten Pflanzen wurden eine Woche lang mit 10 bzw. 100 µM Arsenat behandelt, während die Kontrollen unbehandelt blieben. Wurzeln von vier Pflanzen wurden pro Probe vereinigt und in Flüssigstickstoff gemörsert. Von jeder Behandlung wurden 5 Wiederholungen hergestellt und gemessen. Nach dem Lyophilisieren wurden 10 mg pro Probe eingewogen und weiterverarbeitet. Die Isolation und die Derivatisierungen (Silylierung von alkoholischen Hydroxygruppen oder Binden von Methoxyamin an Aldehyd- oder Ketogruppen) der hydrophilen Metaboliten wurde durchgeführt wie in der Publikation von Weckwerth, W., et al. beschrieben [78]. Die Quantifizierung und Identifikation der Metabolite wurden im Labor von Prof. Dr. Wolfram Weckwerth durchgeführt. Zur besseren Übersicht werden in den Graphen 19-21 die Mittelwerte der 5 Messungen relativ zur Kontrolle dargestellt. Sie müssen signifikant verschieden ($p < 0.05$)

von der Kontrolle sein. Die absoluten Daten sowie die p-Werte sind im Anhang aufgeführt. Zur Berechnung der relativen Werte wurde der Mittelwert der jeweiligen Behandlung durch den Mittelwert der dazugehörigen Kontrolle geteilt. Wenn die Werte der Kontrolle größer waren als die der Behandlung, wurde der Kehrbrech verwendet, das Ergebnis erhielt in diesem Fall allerdings ein negatives Vorzeichen.

4.7 Probengewinnung für Proteommessungen, Langzeit- und Kurzzeitbehandlung

Zur quantitativen Messung des Proteoms wurden die Reispflanzen immer unter den gleichen Bedingungen kultiviert und unterschiedlich lange mit Arsenat behandelt.

Das Medium wurde angepasst, um für das *metabolic labeling* ausschließlich eine Stickstoffquelle austauschen zu müssen. Um möglichst wenige ^{14}N -Quellen zu haben, wurde nach der Keimung und der Wurzelentwicklung das Endosperm so vollständig wie möglich vom Keimling entfernt. Die Hälfte der Karyopsen wurde auf Medium mit ^{15}N -Salzen angezogen, die andere Hälfte war unmarkiert. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge, deren Wurzeln durch den Agar gewachsen waren, in Flüssigmedium gestellt. Bei einem Teil der Pflanzen wurde das Flüssigmedium mit 25 μM Arsenat versetzt, während der andere Teil unbehandelt blieb und als Referenz diente. Da zur genaueren Auswertung reziproke Proben verwendet werden sollten, sind sowohl markierte als auch unmarkierte Pflanzen behandelt worden. Ebenso wurden als Referenz sowohl markierte als auch unmarkierte Pflanzen unbehandelt gelassen (Abb. 6A).

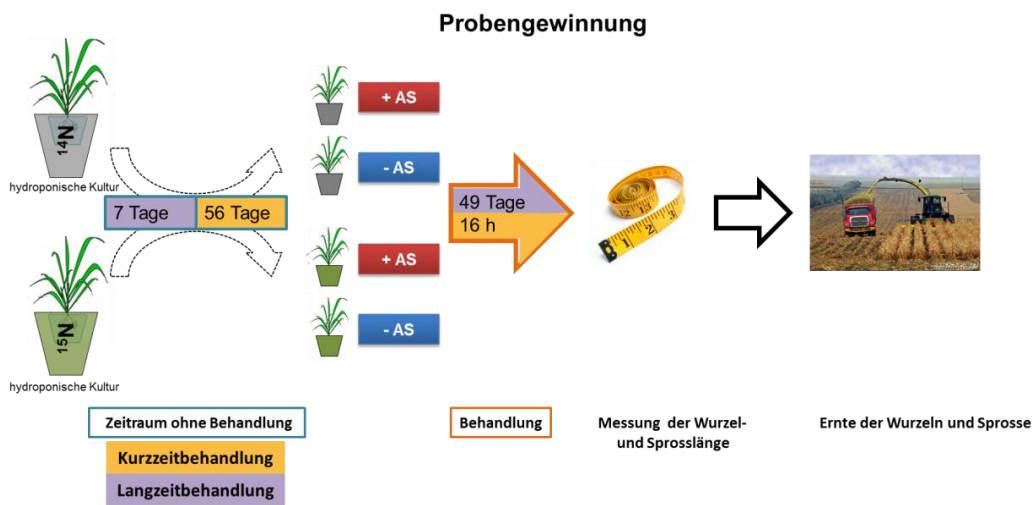
Der Behandlungszeitraum für die Langzeitexposition betrug 49 Tage. Das Alter der Pflanzen bei der Ernte war also 8 Wochen (56 Tage).

Um für die Kurzzeit-Behandlung vergleichbare Pflanzen und Bedingungen zu erhalten, wurden diese über 8 Wochen wie beschrieben in hydroponiken kultiviert und erst anschließend 16 h mit 25 μM Arsenat behandelt (Abb. 6A).

Um einen Effekt von ^{15}N auf das Wachstum auszuschließen, ist einerseits die Kontrolle in den Messungen ein guter Anhaltspunkt, des Weiteren wurden aber auch Wurzellänge und Sprosslänge bestimmt. Da die Behandlung nach 16 h keine Veränderungen in Spross und Wurzellänge bewirken kann, sind für den Vergleich der Wurzellänge nur Daten von der Langzeit-Behandlung dargestellt (Abb. 6 B).

Diese Messungen zeigen, dass ein signifikanter Unterschied besteht zwischen den arsenbehandelten Pflanzen und der Kontrolle. Vergleicht man aber die verschiedenen Stickstoffquellen bei gleicher Behandlung, zeichnet sich kein Unterschied ab (Abb. 6 B).

A



B

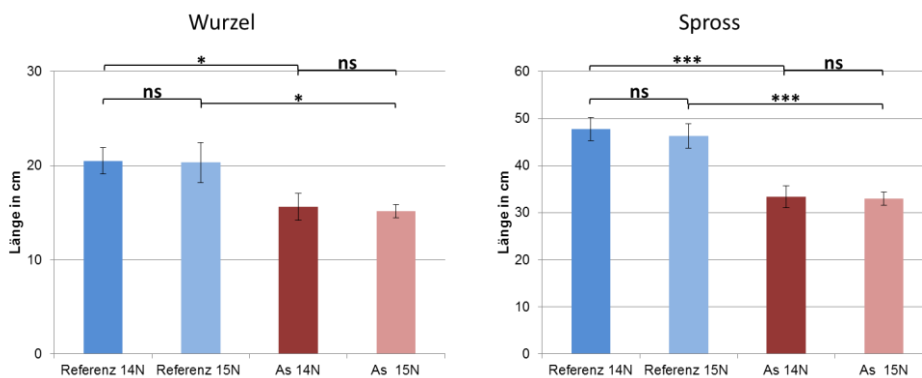


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Probengewinnung und Vergleich des Wachstums.

A: Nachdem die Pflanzen ohne Behandlung in unterschiedlichen Stickstoffisotopen gewachsen sind, wurde die Hälfte der Ansätze – unter Beibehaltung des jeweiligen Stickstoffisotops – mit 25 μM Arsenat behandelt. Vor dem Ernten der Wurzeln bzw. der Blätter wurde ihre jeweilige Länge bestimmt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial geerntet, zerkleinert und, wie in Abbildung 7 dargestellt, kombiniert und weiter prozessiert.

B: In den Diagrammen sind die Messergebnisse der 7 Wochen lang behandelten Pflanzen dargestellt. Im linken Diagramm ist der Mittelwert der gemessenen Wurzellänge dargestellt. Das rechte Diagramm zeigt die entsprechenden Daten für die Sprosslänge. Die blauen Balken stehen hierbei für unbehandelte Pflanzen mit unterschiedlichen Stickstoffisotopen. Die beiden roten Balken stehen hingegen für behandelte Pflanzen – ebenfalls mit unterschiedlichen Stickstoffisotopen. Dies zeigt, dass die Pflanzen aus den verschiedenen Stickstoffquellen (^{15}N oder ^{14}N) keinen signifikanten Unterschied im Wachstum aufweisen. Als Fehlerbalken ist der Standardfehler mit dargestellt, wobei die Mittelwerte aus den Daten von jeweils 24 Pflanzen gebildet wurden.

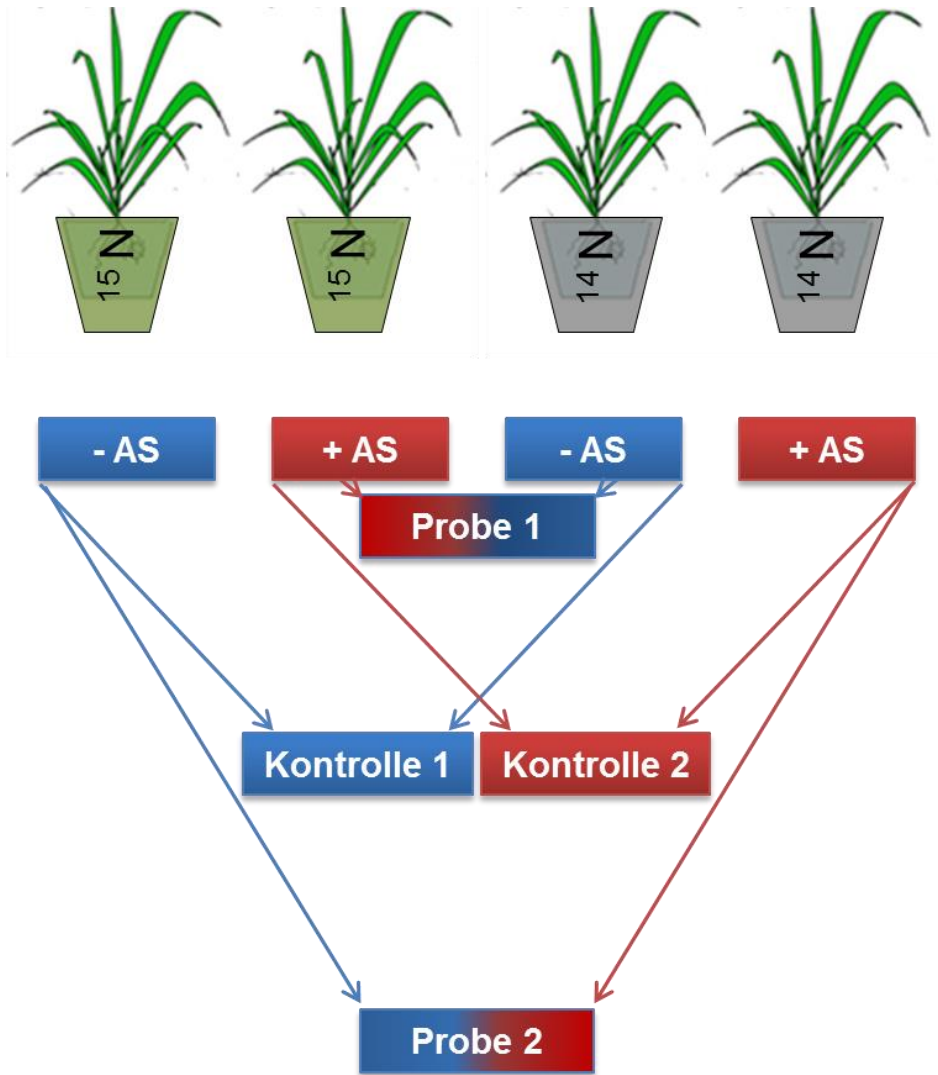


Abbildung 7: Darstellung der Zusammensetzung der reziproken Proben und der Kontrollen

Durch den Einsatz von ^{15}N -Ammoniumnitrat im Medium werden die Proteine markiert (grün). Diese können später in einem Gemisch mit unmarkierten Proteinen (grau) durch ihren Massenunterschied voneinander unterschieden werden.

Markierte und unmarkierte Pflanzen werden dann mit $25\ \mu\text{M}\ \text{Na}_2\text{HAsO}_4$ behandelt.

Für die Quantifizierung werden diese behandelten Proben mit einer unbehandelten Referenz gemischt (Probe 1, Probe 2). Da für die Quantifizierung immer das Verhältnis von ^{15}N zu ^{14}N bestimmt wird, sind Probe 1 und Probe 2 reziprok zueinander. Die Kontrollen bestehen aus unbehandelten (Kontrolle 1) oder behandelten (Kontrolle 2) $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Mischungen. Diese Kontrollen zeigen nur Änderungen an, die nichts mit der Behandlung zu tun haben.

4.7.2 Anreicherung der Kern- und Zellorganellenfraktion und Proteinisolation

Der Isolation der Proteine wurde eine Anreicherung von Kernen und Zellorganellen vorangestellt. Dazu wurde eine Gradientenzentrifugation mit Ficoll[®] durchgeführt. Dies ist hilfreich, da bei der Messung des ganzen Proteoms eventuell stark exprimierte Proteine andere maskieren. Daher ist das Wegfallen von einem Großteil der vakuolären, chloroplastischen und cytoplasmatischen Proteinen von Vorteil. Darüber hinaus galt den regulatorischen Elementen im Kern und den Proteinen des Energiestoffwechsels und somit den Proteinen in den Mitochondrien besonderes Interesse.

Die Proteinisolation erfolgte bei 4°C.

Das Pflanzenmaterial (0,5 g) wurde in 50 ml eines Tris-Puffers (pH 8) mit einem Haushaltsmixstab mehrmals gut zerkleinert. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht zu stark erwärmt wurden. Der Puffer enthielt 1 mM DTT, 0,2 % Triton X 100, 5 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,46 M Saccharose, 0,5% Ficoll[®] und pro Probe eine Tablette Protease-Inhibitor. Anschließend wurde jede Probe durch 4 Lagen Miracloth gefiltert. Der Durchfluss wurde 5 min bei 50 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Der Überstand wurde bei 200 g und 4°C 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit dem gleichen Puffer ohne Triton gewaschen. Proben von den Pellets wurden mit DAPI versetzt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Neben Zellwandfragmenten war in allen Proben auch immer eine große Anzahl an Kernen vorhanden (Daten nicht gezeigt). Die Pellets wurden in 30 µl von einem 150 mM Tris-Puffer (pH 6,8) mit 7% SDS aufgenommen und 5 min auf 80°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben in Stickstoff eingefroren und im Ultraschallbecken 1 min auf höchster Stufe beschallt. Die Proben wurden dann bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den gelösten Proteinen in neue Gefäße überführt. Die Proteinmenge wurde mit Amidoschwarz bestimmt [79].

Im Proteomzentrum Tübingen bzw. im Life Science Center der Universität Hohenheim wurden die Proben auf ein Proteingel aufgetragen (vgl.[80]). Die Elektrophorese wurde gestoppt, bevor sich die Proteine trennen (ca. 1 cm Laufstrecke). Auf diese Weise können die Proteine von Verunreinigungen wie DNA, RNA, Lipiden und Zuckern getrennt werden. Nach dem Ausschneiden der Proteinbanden wurden diese mit Iodacetamid alkyliert, mit Trypsin verdaut und entsalzt [80]. Zum Entsalzen wurden C18 StageTips verwendet [81]. Die Peptide wurden mittels einer HPLC in einem 106 min 5%-33% Gradienten aufgetrennt [80]. Hierbei wurde die mit 0,5% Essigsäure angesäuerte wässrige Lösung (A) langsam mit einer 80% Acetonitril/0,5% Essigsäure-Lösung (B) gemischt. Die Peptide waren an eine C18 Säule gebunden. Die durch den Gradienten aufgetrennten Peptide wurden anschließend online durch eine Nanoelectrospray-Einheit ionisiert und dann im Massenspektrometer gemessen.

4.8 Prozessieren der Rohdaten aus den massenspektrometrischen Messungen

Die Rohdaten wurden dann von Prof. Dr. Waltraud Schulze verwendet, um mittels Mascot sowohl die gemessenen ^{14}N -Peptide als auch die ^{15}N -Peptide zu identifizieren. Es wurde das Reis-Vergleichsproteom von Uniprot verwendet.

Die Einstellungen waren: Peptid Toleranz 10 ppm; MS/MS Toleranz 0,8 Da; Ladung des Peptids 2^+ und 3^+ . Als erlaubte Modifikationen wurden die Alkylierung von Cysteinresten und die Oxidation an Methionin eingestellt.

Mit den Rohdaten und den Mascotergebnissen konnte dann von mir die Quantifizierung mit Hilfe des Programms MS Quant vorgenommen werden. Durch die gleichen chemischen Eigenschaften von ^{14}N -Peptiden und ^{15}N -Peptiden eluieren diese Peptide gleichzeitig von der Säule bei der Flüssigkeitschromatographie. Im Massenspektrometer können diese aber durch den *mass shift* differenziert werden. MS Quant vergleicht die Intensität der ^{14}N -Peptide und der mittels *mass shift* separierten ^{15}N -Peptide eines Peaks und kann sie auf diese Weise quantifizieren [75, 76, 82]. Es wurden nur Peptide quantifiziert, die von Mascot durch den höchsten Rang einem Protein zugeordnet wurden. Jedes Protein musste durch eindeutige Peptidsequenzen in den jeweils reziproken Proben identifiziert worden sein. Außerdem wurden Peptide, die mehr als eine theoretische Schnittstelle (*missed cleavage sites*) für Trypsin beinhalten, verworfen.

Um die Qualität der Daten zu überprüfen, wurden für die Venndiagramme (Anhang), die Gegenüberstellung der reziproken Proben sowie die Statistik Peptide bis zu einem Ionscore von 24 zugelassen. Mascot gibt für das verwendete Vergleichsproteom an, dass bei einem Ionscore von > 27 die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung/Homologie unter 5% liegt. Dennoch ist es sinnvoll, auch Proteine zu betrachten, deren Peptide unter dieser Grenze liegen, um deren biologische Relevanz eventuell einordnen zu können. Für die abschließende Analyse wurden dann ausschließlich Peptide verwendet mit einem Ionscore > 27 . Ein weiteres Kriterium war, dass in einer der beiden Messungen das Protein durch mindestens zwei verschiedene Peptide beschrieben wird.

Nachdem die Daten quantifiziert und die Proteine identifiziert waren, wurden diese normalisiert und statistisch ausgewertet. Hierfür wurden die Verhältnisse zwischen ^{15}N -Peptiden und ^{14}N -Peptiden für das zugehörige Protein gemittelt und als \log_2 -Wert dargestellt (Abbildungen 23-25). Die Normalisierung der Daten ist notwendig, um eventuelle Abweichungen beim Mischen oder bei der Aufreinigung auszugleichen. Zum Normalisieren wurde daher von den \log_2 -Werten jeder Messung der Median bestimmt. Anschließend wurde von jedem \log_2 -Wert derselben Messung dieser Median subtrahiert.

4.8.1 Kombinieren von Daten technischer Replikate

Im Falle der Langzeitbehandlung wurde von den Wurzeln ein zusätzliches technisches Replikat gemessen. Nach Normalisierung konnten diese Proben verglichen werden. Beim Kombinieren von Daten aus verschiedenen Messungen wurden nur Peptide mit einem Ionscore > 31 verwendet. Ein Protein musste in jeder Messung durch mindestens zwei Peptide beschrieben werden. Zeigte sich beim Vergleich dieser beiden Messung ein nicht reziproker, weitgehend linearer Zusammenhang, wurden diese kombiniert, indem der Mittelwert gebildet wurde (Daten im Anhang, Tabelle 1). Diese Einschränkungen sind notwendig, da diese Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Proteomzentren gemessen wurden. Um den Unterschieden zwischen den Proben gerecht zu werden, wurde jeweils dieselbe Kontrolle gemessen. Für die Auswertung wurden dann die Werte aller Kontrollmessungen aufgetragen, um eventuellen Abweichungen bei den Messungen Rechnung zu tragen. Dies wäre beim Verrechnen der Kontrolldaten nicht der Fall.

Die Proteine, die in diesen beiden Proben identifiziert wurden, zeigen eine hohe Übereinstimmung (Abb. 8). Es zeigt sich, dass die Werte – von wenigen Ausreißern abgesehen – die gleiche Tendenz zeigen. Ohne diese Ausreißer liegt das Bestimmtheitsmaß R^2 für eine lineare Funktion bei 0,8. Dabei sollte man bedenken, dass diese Proben in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Geräten gemessen wurden. Da die Proben nicht reziprok sind und die Pflanzen unter gleichen Bedingungen gewachsen sind, ist auch die Steigung der Ausgleichsgeraden, die nahezu 45° beträgt, richtig. Die Ausreißer konnten alle durch eine hohe Varianz zwischen den Peptidmengen, die in der gleichen Messung ein Protein beschreiben, erklärt werden.

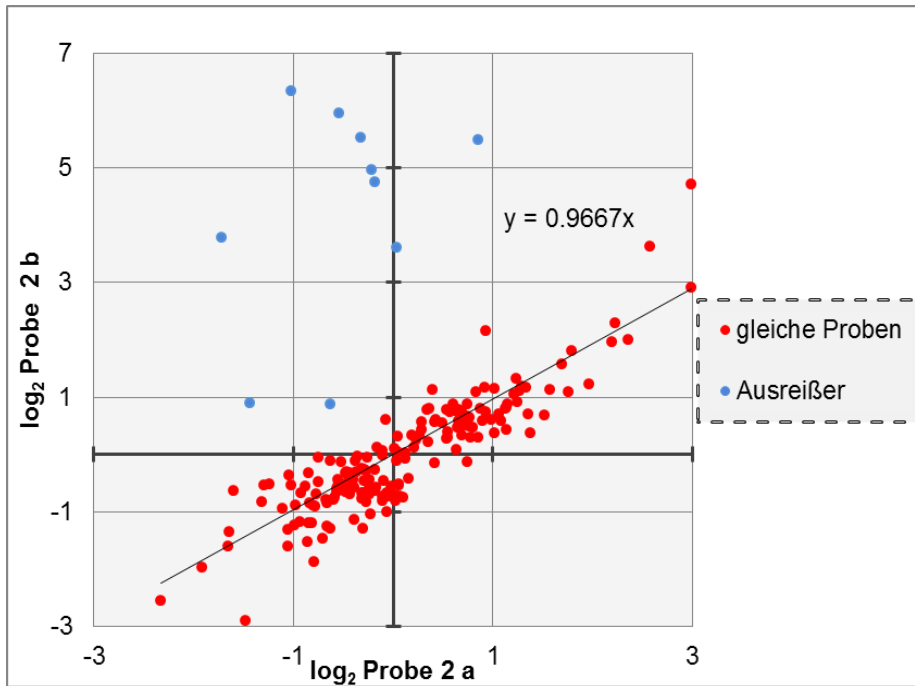


Abbildung 8: Vergleich zweier technischer Replikate

Zwei technische Replikate gegeneinander aufgetragen. Im Idealfall beschreiben die Datenpunkte eine 45°-Funktion zur x-Achse. Da die Proben nicht reziprok sind, sondern einander exakt entsprechen, haben die log₂-Werte der beiden Messungen das gleiche Vorzeichen.

4.8.2 Verhalten der Kontrolldaten unterschiedlicher hydroponischer Kulturen

In der Theorie und bei absolut gleichbleibenden Bedingungen und ohne Messfehler würden sich die Kontrollpunkte um den Ursprung anordnen. Da aber durch Faktoren wie den Verbrauch an Nährstoffen sowie leichte Schwankungen der Wachstumsbedingungen etc. diese absolut gleichbleibenden Bedingungen nicht realisierbar sind, zeigt sich in der Praxis ein anderes Bild. Da die zusammengehörigen Kontrollen den gleichen Schwankungen unterworfen sein sollten, beschreiben diese gegeneinander aufgetragen eine lineare Funktion im 45°-Winkel zur x-Achse. Diese Funktion unterscheidet sich allerdings von derjenigen, die sich aus dem Auftragen der reziproken Proben ergibt. Im Falle der Kontrollen haben die x- und y-Werte nicht gegensätzliche, sondern gleiche Vorzeichen. Mit anderen Worten, die Daten der Kontrollen verteilen sich gemäß einer linearen Funktion im Diagramm „von links unten nach rechts oben“.

Auf die gleiche Art und Weise wie die oben beschriebenen technischen Replikate wurden für die Wurzelmessungen auch die jeweiligen Messungen von Kontrollen aus unbehandeltem Pflanzenmaterial (Kontrolle 1) kombiniert. Es wurden also die beiden Messungen der Kontrolle 1 von der Langzeitbehandlung kombiniert bzw. die beiden Messungen der Kurzzeitbehandlung sowie zwei weitere Messungen von Kontrolle 1, die

im Proteomzentrum in Hohenheim prozessiert wurden und von einem weiteren unabhängigen Ansatz stammen.

Da die unbehandelten Kontrollen bei gleichbleibender Kultivierung keine bzw. wenig Veränderungen aufweisen sollten, wurden diese miteinander verglichen. So werden in Abbildung 9 diese Kontrollen von Langzeit- und Kurzzeitbehandlung sowie eine zusätzliche unabhängige Kontrolle gegeneinander aufgetragen. Auf diese Weise kann ermittelt werden, wie groß die Unterschiede zwischen diesen Kulturen sind. Dies ist wichtig, da sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlichen Klimakammern aufgezogen und unabhängig voneinander isoliert wurden. Die Beziehungen dieser drei Kontrollen weicht zwar von der 45° Achse ab, aber sie zeigt eine deutliche Häufung um den Ursprung und entlang der x- bzw. der y-Achse (Abb. 9, blaue Funktion). Aufgetragen mit den ursprünglichen Kontrollen (nicht kombiniert, Abb. 9, rote Funktion), ergibt sich ein gut abgegrenzter Bereich für die Kontrollen insgesamt. Damit ein Protein in seiner Abundanz sicher als verändert gilt, wurde daher anhand dieses Schaubildes eine weitere Bedingung festgelegt. Diese Bedingung für eine sichere Veränderung verlangt, dass die \log_2 -Werte bei den Messungen größer sein müssen als 0,4 bzw. kleiner als -0,4. Die Kontrollpunkte, die außerhalb dieser Grenzen liegen, machen weniger als 1 % der Gesamtmenge der Kontrollpunkte aus. In Anbetracht der Unterschiede zwischen den Kulturen zeigt sich somit, wie robust die Kulturen waren und dass die Kontrollen von Langzeit- und Kurzzeitbehandlung miteinander vergleichbar sind.

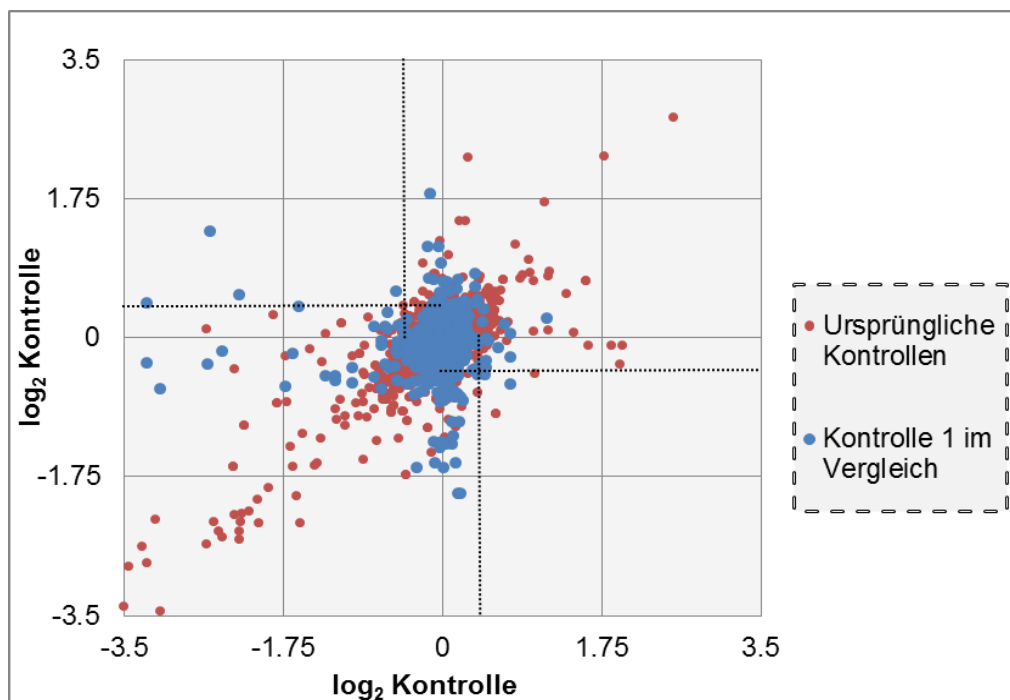


Abbildung 9: Vergleich von drei verschiedenen Kontrollmessungen

Die unbehandelten Kontrollen der Wurzelproben und ihre Streuung um die Achsen.

In Rot sind die ursprünglichen Kontrollen der drei Messungen zusammen aufgetragen. Die blauen Punkte zeigen an, was geschieht, wenn man die Kontrollmessungen von Kulturen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewachsen sind, gegeneinander aufträgt. Das kann hilfreich sein, um z.B. →

sicherzustellen, dass die Kulturen von Langzeit- und Kurzzeitbehandlung vergleichbar sind. Die gepunkteten Linien zeigen die Grenzen an, die gewählt wurden, um den Bereich zu markieren, außerhalb von dem sich die behandelten Proben von allen Kontrollen unterscheiden.

4.9 Statistik zur Differenzierung von Kontrollen und der in ihrer Abundanz veränderten Proteine

Das Ziel der Statistik ist es, diejenigen Messwerte aus den reziproken Messungen zu ermitteln, die sich signifikant von den Kontrolldaten unterscheiden. Hierfür eignen sich die \log_2 -Werte, die, wie oben beschrieben, für alle Kontrollen und die reziproken Messungen ermittelt werden konnten. Trägt man die zusammengehörigen Kontrolldaten gegeneinander auf, lassen sich auf die im Folgenden beschriebene Weise lokale Konfidenzintervalle bestimmen. Durch diese Konfidenzintervalle lässt sich aussagen, dass die Kontrollen und die Datenpunkte außerhalb dieser Grenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit voneinander verschieden sind (Abb. 10).

4.9.1 Vorgehen bei der statistischen Auswertung

Zur statistischen Bewertung wurden die Daten als Datenmatrix um 45° gedreht (Beispiel in Abb. 10). Auf diese Weise konnten die Kontrollen in Abschnitte entlang der x-Achse eingeteilt werden. Im Idealfall und ohne Messfehler wären die Messergebnisse der zusammengehörigen Kontrollmessungen für jedes Protein gleich. Nach der Drehung lägen die Datenpunkte der Kontrollmessung somit allesamt auf der x-Achse. Damit stellt nach Drehung der Kontrolldaten der Abstand der Datenpunkte zur x-Achse ein Maß für die Messungenauigkeit dar. Das ermöglicht es, nur Daten weiter zu verwenden, die sich von den Kontrolldaten und deren Abweichung von der 45° -Achse unterscheiden. Abbildung 10 ist ein Beispiel für das Verfahren, gezeigt am Datensatz von Proteine aus den Sprossen langzeitbehandelter Pflanzen. Nach der Drehung kann man die Kontrollen also in Abschnitte mit jeweils mindestens drei Datenpunkten einteilen und für diese Abschnitte ein lokales Konfidenzintervall von 99% bestimmen (Abb. 10). Nach dem Zurückdrehen der Matrix konnten dann anhand der definierten Bereiche jene Daten ermittelt werden, die sich mit mindestens 99%iger Sicherheit von den Kontrollen unterscheiden, und ihre p-Werte konnten ermittelt werden.

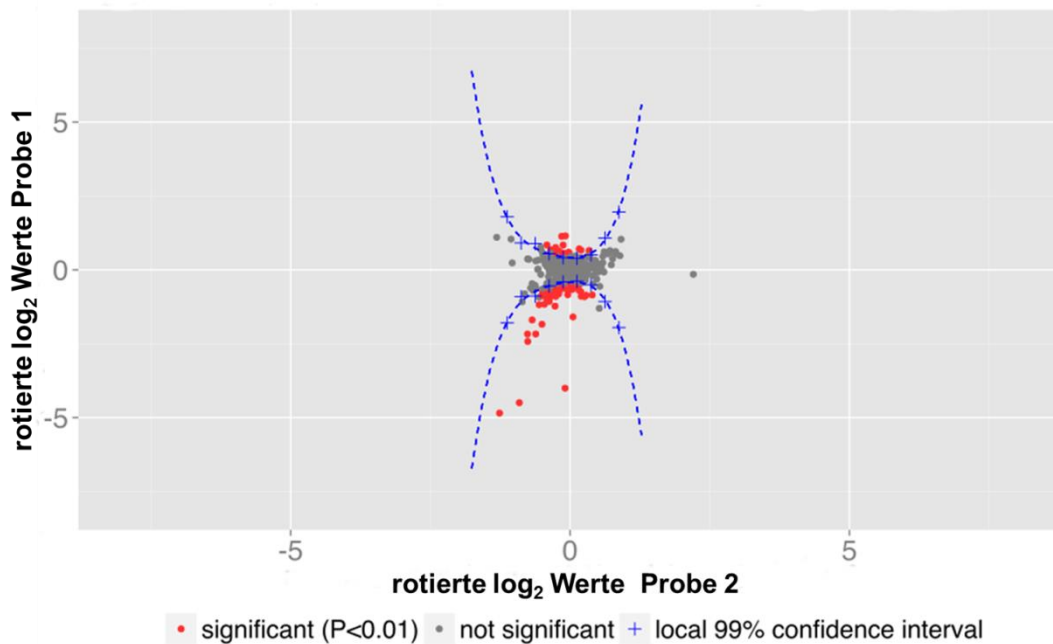


Abbildung 10: Rotieren der Daten zur Bestimmung lokaler Konfidenzintervalle

Daten von Proteine aus den Sprossen langzeitbehandelter Pflanzen, um 45° rotiert. Die blauen Kreuze zeigen die durch die Kontrolle ermittelten lokalen Konfidenzintervalle. Rote Punkte sind signifikant verschieden von der Kontrolle.

4.9.2 Statistische Auswertung der Proteomdaten von kurzzeitbehandelten Pflanzen

Im Falle der Kurzzeitbehandlung zeigte sich, dass die beiden reziproken Messungen und die Kontrollen nahezu keine Unterschiede zeigen (Abb. 24). Daher wurde auch keine statistische Auswertung der Daten durchgeführt.

4.9.3 Voraussetzungen für die Vereinigung von Daten

Im Fall, dass mehrere Messungen der gleichen Bedingungen vorliegen, wurden diese vereinigt, wenn folgende Voraussetzungen gegeben waren:

- Ein quantifiziertes Protein musste durch mindestens 2 Peptide beschrieben werden
- Diese Peptide haben einen Ionscore von > 32
- Die Funktion beider Messungen zeigt einen linearen Zusammenhang um die Funktion $x=y$ (Abb. 8).

Die Grenze für den Ionscore wurden von 27 auf 32 erhöht, da die Messungen zum Teil an unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden oder die Pflanzen zu unterschiedlichen Zeiten oder in unterschiedlichen Klimakammern aufgezogen wurden. Durch die besonders streng gesetzte Grenze sollte somit ausgeschlossen werden, dass durch Unterschiede in der Versuchsdurchführung verursachte Änderungen als arsenbedingte Effekte fehlinterpretiert würden.

Waren diese Bedingungen erfüllt, wurde für diese Proteine der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet.

4.9.4 Kriterien für ein in der Abundanz verändertes Protein

Als ein „in der Abundanz verändertes Protein“ wurden also grundsätzlich Proteine angesehen, die die folgenden Bedingungen erfüllen:

- Das Protein musste in beiden reziproken Messungen sicher identifiziert werden
- Das Protein musste durch insgesamt mindestens 3 Peptide identifiziert werden
- Der Ionscore dieser Peptide musste über 27 liegen

Für die Quantifizierung wurden die Mittelwerte der quantifizierten Peptide verwendet, die die oben genannten Bedingungen erfüllen. Diese Mittelwerte müssen weitere Bedingungen erfüllen, damit das zugehörige Protein als verändert gilt:

- Die Mittelwerte müssen sich von den Kontrollen unterscheiden (p-Wert < 0,01) (Abb. 10 bzw. Anhang, Tabelle 2).
- Der \log_2 -Mittelwert von beiden reziproken Messungen muss größer als 0,4 bzw. kleiner als -0,4 sein (Abb. 9 bzw. Anhang, Tabelle 2).

4.9.5 Darstellung der Daten und das Einordnen in Stoffwechselabläufe

Anschließend wurden diese in der Abundanz veränderten Proteine weiter bearbeitet. Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Referenz wurde in *Fold* angegeben. Da die Daten aus zwei Messungen resultieren, wurden Mittelwerte vom Betrag der \log_2 -Werte dieser reziproken Messungen gebildet. Um zu errechnen, um wie viele Male (*fold change*) sich die Proteinmenge bei Arsenstress verändert, wurde dieser gemittelte \log_2 -Wert als Exponent zur Basis 2 verwendet. Bei herunterregulierten Proteinen wurden diese mit einem negativen Vorzeichen versehen.

Mithilfe der RAP-ID (Rice Annotation Project) für die jeweiligen Proteine war in den meisten Fällen das Ermitteln von Identifikationscodes anderer Datenbanken möglich. Auf diese Weise konnten dann die hier diskutierten Proteomdaten in Datenbanken wie Uniprot oder Gramene bzw. durch das Mappingtool vom Max-Planck-Institut in Potsdam, Mapman, Stoffwechselwegen zugeordnet werden [83].

Durch die Zuordnung der Locus-ID war auch ein Vergleich mit den verfügbaren Transkriptomdaten möglich. Bei diesen Vergleichen wurde allerdings nur betrachtet, ob die Proteine auch in den Transkriptomdaten – nach den Kriterien der verschiedenen Autoren – verändert waren. Es wurde also keine statistische Neubewertung der jeweiligen Rohdaten vorgenommen. Anschließend wurde abgeglichen, ob sie in die gleiche Richtung reguliert sind wie bei der Proteomstudie in dieser Arbeit (vgl. Anhang, Tabelle 2).

In der Transkriptomstudie von Lu-jun, Yu et al. [12] wurden sehr verschiedene Bedingungen miteinander verglichen. Daher wurden für den Vergleich mit den in dieser Arbeit analysierten Proteomdaten nur diejenigen Transkripte akzeptiert, die in allen Messungen der Wurzeln die gleiche Tendenz zeigen.

5. ERGEBNISSE

5.1 Auswirkungen von Arsenat auf die Keimung, das Wurzel- und Sprosswachstum

Um zu untersuchen, welche Auswirkung Arsen auf die in dieser Arbeit verwendete Reissorte hat und welche Prozesse beeinflusst werden, wurden physiologische Versuche durchgeführt. Die in den Proteom- und Phänotypuntersuchungen verwendeten Arsenkonzentrationen wurden im Vergleich zu anderen Untersuchungen sehr niedrig gewählt. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die Konzentrationen nicht zu sehr von den natürlich vorkommenden Bedingungen abweichen und dass die Pflanzen bei einer Langzeitbehandlung nicht absterben. In Bangladesch wurden im Grundwasserleiter Arsenkonzentrationen von 10 bis 5000 µg/l (0,13-66,73 µM) gemessen [84, 85]. Damit lagen die Konzentrationen von 25 und 50 µM für die Proteom- und Phänotypuntersuchungen noch im Rahmen der natürlich vorkommenden Konzentrationen. Zunächst musste jedoch überprüft werden, ab welchen Konzentrationen Arsenat Auswirkungen auf die Reispflanzen hat.

Reis wurde verschiedenen Arsenatkonzentrationen ausgesetzt. Dies hatte Auswirkungen auf die Keimung, die Wurzelmorphologie sowie das Spross- und Wurzelwachstum. Die Keimungsrate von *Oryza sativa* L. bei verschiedenen Arsenkonzentrationen zeigte, dass erst bei einer Konzentration von 500 µM Arsenat eine verringerte Keimungsrate auftrat (Abb. 11A). Das Wachstum von Spross (Abb. 11B) und Wurzel (Abb. 11C) war schon bei Konzentrationen von 13 µM erkennbar reduziert. Beim Vergleich der Wachstumsreduktion von Sprossen und Wurzeln fiel auf, dass der Effekt (im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen) auf die Wurzel stärker war als auf den Spross. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch, wenn zwei Wochen alte unbehandelte Pflanzen anschließend mit Arsenat behandelt wurden. In den Abbildungen 11D und E sind die Pflanzen vor der Behandlung aufgenommen worden. Abbildungen 11F und G zeigen die jeweils gleichen Pflanzen nach 7-tägiger Arsenatbehandlung. Die Kontrolle links in den Bildern blieb unbehandelt, die Pflanzen in der Mitte wurden mit Phosphat behandelt und die Pflanzen rechts im Bild wurden mit Arsenat behandelt. In Abbildung 11F sind die Pflanzen zu sehen, die mit 10 µM Phosphat bzw. Arsenat behandelt wurden, sowie die zugehörigen Kontrollen. Das Sprosswachstum war nach der Behandlung augenscheinlich kaum verändert. Betrachtet man allerdings die Pflanzen in Abbildung 11G, die mit 100 µM Phosphat bzw. Arsenat behandelt wurden, ist schon ohne Quantifizierung bei den arsenbehandelten Pflanzen ein reduziertes Sprosswachstum auszumachen.

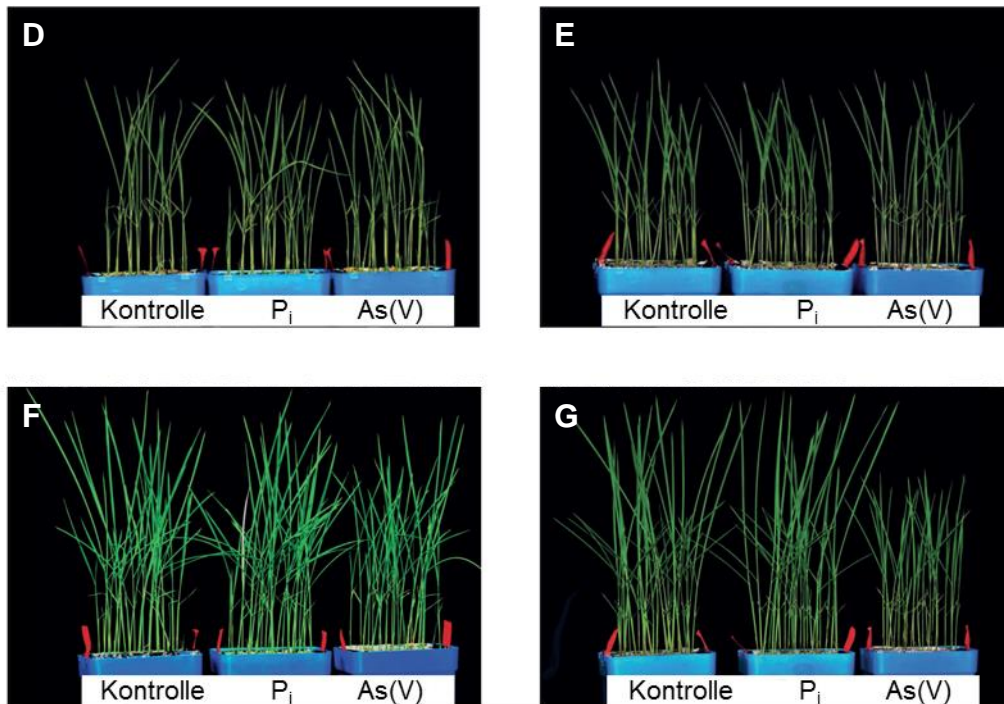
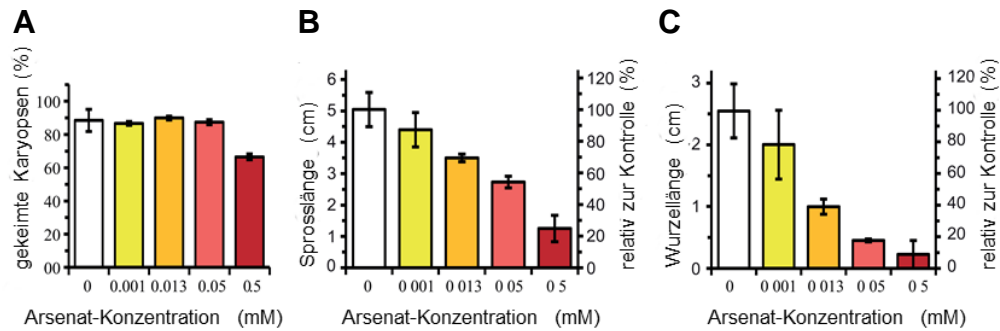


Abbildung 11: Physiologische Effekte von Arsenat verschiedener Konzentrationen auf die Keimung und das Wachstum von *Oryza sativa* L. Pflanzen.

Reiskaryopsen wurden in Wasser mit verschiedenen Konzentrationen an Arsenat zum Keimen gebracht.

A: Relative Keimungsrate von 100–115 Reiskaryopsen (pro Behandlung) nach 9-tägiger Exposition mit Arsenat verschiedener Konzentrationen.

B: Sprosslänge und prozentuales Sprosswachstum relativ zur Kontrolle von Reiskeimlingen nach 9-tägiger Exposition mit Arsenat unterschiedlicher Konzentration.

C: Wie B in Bezug auf die Wurzellänge.

D-G: Phänotypischer Effekt von Arsenat und Phosphat auf zwei Wochen alte Reispflanzen. **D** und **E** zeigen die Pflanzen vor der Behandlung, während **F** die Pflanzen nach einer 7-tägigen Behandlung mit 10 µM Arsenat bzw. 10 µM Phosphat und **G** die Pflanzen nach einer Behandlung mit 100 µM Arsenat bzw. 100 µM Phosphat darstellt.

Messungen des zusätzlichen Wachstums in der Zeit der Arsenexposition ergaben ein detaillierteres Bild (Tabelle 1). Sowohl bei den Wurzeln als auch bei den Sprossen hatte Arsen einen Effekt auf die Wachstumsrate. Der Effekt der Behandlung mit 100 µM Arsenat

war in beiden Geweben sehr viel stärker als mit nur 10 μM . Zusätzliches Phosphat hatte hingegen kaum einen Einfluss, während das Wurzelwachstum bei 100 μM Arsenat komplett zum Erliegen kam.

Behandlung	Sprosslänge in $\text{cm} \pm \sigma$				Wurzellänge in $\text{cm} \pm \sigma$			
	Start	Ende	Zuwachs	% der Kontrolle	Start	Ende	Zuwachs	% der Kontrolle
Kontrolle (125 μM P_i)	11,9 \pm 3,9	23,6 \pm 4,4	11,6 \pm 2,9	100	7,6 \pm 2,4	12,9 \pm 2,4	5,3 \pm 2,6	100
+ 10 μM As (V)	13,3 \pm 4,1	22,1 \pm 5,1	9,8 \pm 2,1	86 *	8,8 \pm 2,3	12,6 \pm 2,2	3,8 \pm 1,3	72 *
+ 100 μM As (V)	12,3 \pm 4,1	16,5 \pm 5,1	4,3 \pm 2,3	37 ***	9,0 \pm 2,1	9,0 \pm 2,1	0	0 ***
+ 10 μM P_i	11,9 \pm 3,9	23,6 \pm 4,4	11,9 \pm 1,6	102	9,2 \pm 2,3	14,3 \pm 3,0	5,2 \pm 1,9	97

Tabelle 1: Durch Arsenat induzierte Veränderungen im Wachstum von Reis

Längenzuwachs von Sprossen und Wurzeln von Reispflanzen während einer 7tägigen Behandlung mit Arsenat bzw. Phosphat im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die zwei Wochen alten Pflanzen wurden in 1/10 MS-Medium kultiviert und 7 Tage lang verschiedenen Arsen- oder Phosphatkonzentrationen ausgesetzt.

σ = Standardabweichung

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Durch die ähnliche Struktur von Arsenat und Phosphat war auch der Effekt von einer Kombination dieser beiden Ionen auf das Wachstum interessant. Daher wurden Karyopsen in Wasser zur Keimung gebracht und entweder 9 Tage lang nicht behandelt (Kontrolle), mit 100 μM Arsenat bzw. Phosphat behandelt oder aber einer Kombination von beidem ausgesetzt. Es zeigte sich, dass die zusätzliche Gabe von Phosphat die negativen Effekte von Arsenat abschwächt (vgl. Tabelle 2). Das verstärkte Wachstum in diesem Versuch, das bei der alleinigen Phosphatgabe zu beobachten war, ist darauf zurückzuführen, dass hier im Gegensatz zum in Tabelle 1 wiedergegebenen Versuch kein Nährmedium verwendet wurde, sondern nur Wasser.

As(V)/P _i (μM)	Sprosslänge in cm ± σ		Wurzellänge in cm ± σ	
	Zuwachs	% der Kontrolle	Zuwachs	% der Kontrolle
0 / 0	3,9 ± 1,4	100	2,0 ± 1,0	100
0 / 100	4,6 ± 1,6	118 ***	2,5 ± 1,2	121 **
100 / 0	2,3 ± 1,1	59 ***	0	0 ***
100 / 100	2,9 ± 1,0	73 ***	0,5 ± 0,3	26 ***

Tabelle 2: Auswirkungen von Phosphat auf die arseninduzierten Wachstumsreduktion

Durchschnittliche Spross- und Wurzellänge von *Oryza sativa* L. Pflanzen in Wasser, die während der Keimung und unmittelbar im Anschluss weitere 9 Tage lang Arsenat, Phosphat oder einer Kombination von beidem ausgesetzt waren.

σ = Standardabweichung

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

Die infolge der Arsenatapplikation gemessenen Änderungen des Wurzel- und Sprosswachstums zeigen eine klare Differenz der Reaktion der beiden Organe. Diese Beobachtung korreliert mit der in diesen Organen nachgewiesenen stark unterschiedlichen Mengen an akkumuliertem Arsenat [28]. Daher war es wichtig, diese Organe getrennt voneinander zu analysieren.

5.2 Phänotypische Veränderungen der Reiswurzel infolge einer Arsenintoxikation

Im Zuge der Behandlung mit Arsenat verfärbten sich die Reiswurzeln zunehmend bräunlich, bis nach einigen Tagen eine tiefbraune Färbung der ganzen Wurzel zu sehen war. Dieser zuvor nicht berichtete Phänotyp, der in verschiedenen Reisvarietäten zu beobachten war (nicht gezeigt), wurde näher untersucht. Die Untersuchungen beinhalteten Färbungen sowie die Extraktion der färbenden Stoffe aus der Zellwand. Unter den in dieser Arbeit geschaffenen Bedingungen waren die Arsenat-induzierten Verfärbungen der Wurzeln zuverlässig und in verschiedenen Nährmedien darstellbar. Bei Behandlung der Pflanzen mit Arsenit zeigte sich die gleiche Reaktion der Wurzeln wie mit Arsenat, allerdings war diese um ca. 4 Tage verzögert. Dadurch kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Arsenit zunächst zu Arsenat umgewandelt wird, bevor es die Verfärbung auslöst.

Um festzustellen, ob dieser Phänotyp arsenspezifisch ist oder generell durch toxische Metalle ausgelöst werden kann, wurden Reispflanzen mit verschiedenen Metallen behandelt. Diese Metalle hatten allesamt einen toxischen Effekt auf die Pflanze, was durch eine Wachstumsreduktion der Wurzeln bzw. der gesamten Pflanze offensichtlich wurde (Abb. 12).



40 µM 400 µM 100 µM 50 µM 50 µM

Kontrolle PbCl₂ ZnCl₂ CuCl₂ Na₂HAsO₄ CdCl₂

Abbildung 12: Phänotyp von 5 Wochen alten Reispflanzen, die Arsenat bzw. verschiedenen Metallen ausgesetzt wurden

Reaktion der Reisswurzel (Varietät *Gladiá*) auf verschiedene toxische Metalle nach fünf Wochen Exposition. Jeweils zwei repräsentative Pflanzen pro Behandlung sind abgebildet.

Eine Verfärbung der Wurzeln war jedoch nur bei Arsen und Kupfer zu erkennen. Allerdings konnte die Verfärbung bei den mit Kupfer behandelten Pflanzen im Gegensatz zu den arsenatbehandelten Pflanzen durch Salzsäurebehandlung entfernt werden, was auf eine Abscheidung des Metalls auf der Wurzeloberfläche hindeutet.

Im Anschluss wurden Reispflanzen unterschiedlichen Arsenkonzentrationen ausgesetzt, um eine Konzentrationsabhängigkeit der Verfärbung zu ermitteln. Eine Verfärbung war bereits bei einer Konzentration von 10 µM Arsenat zu erkennen; eine maximale

Verfärbung war bei einer Konzentration von 100 μM zu beobachten. Die Verfärbung setzte nach ungefähr vier Tagen Exposition ein. Dabei fiel auf, dass die Intensität vom Wurzelschaft zur Wurzelspitze hin abnahm.



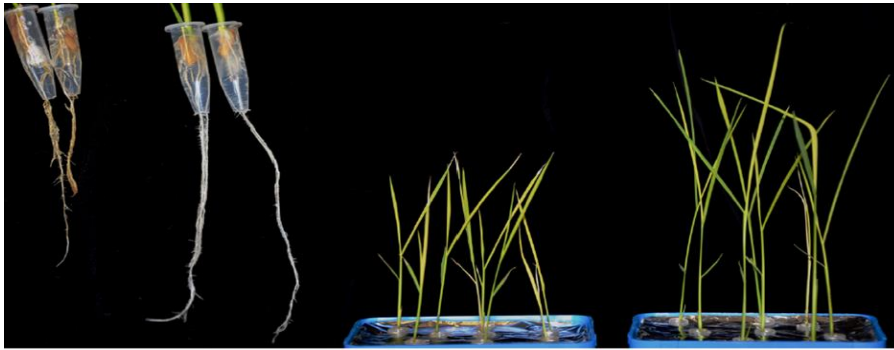
50 μM 25 μM 10 μM 5 μM

Kontrolle AsO_4^{3-} AsO_4^{3-} AsO_4^{3-} AsO_4^{3-}

Abbildung 13: Physiologischer Effekt von Arsenat verschiedener Konzentrationen auf die Färbung von Reiswurzeln

Reispflanzen wurden für 3 Wochen unter identischen Bedingungen in Hoagland-Medium aufgezogen, das mit den angegebenen Konzentrationen an Arsenat versetzt war. Die Abbildung zeigt die Wurzelsysteme von je zwei repräsentativen Pflanzen pro Behandlung.

Da in Medien, in denen Eisen zur Verfügung steht, besonders unter anoxischen Bedingungen eine Braunfärbung der Wurzeln durch die Bildung von Eisenplaques gezeigt werden konnte [33], musste dies als Ursache für die beobachteten Veränderungen ausgeschlossen werden. Eine Differenzierung ist möglich, indem man die Wurzeln in Salzsäure wäscht, denn auf diese Weise können Eisenplaques entfernt werden [33]. Im Fall der arsenbehandelten Wurzeln führte diese Behandlung jedoch zu keiner Entfärbung der Wurzeln (Daten nicht gezeigt), was die Bildung von Eisenplaques sehr unwahrscheinlich erscheinen lässt. Um eine Eisenplaquebildung komplett auszuschließen, wurden Pflanzen Arsenat in einem Medium ausgesetzt, das kein Eisen enthielt (Abb. 14).



50 µM

AsO_4^{3-}

Kontrolle

50 µM

AsO_4^{3-}

Kontrolle

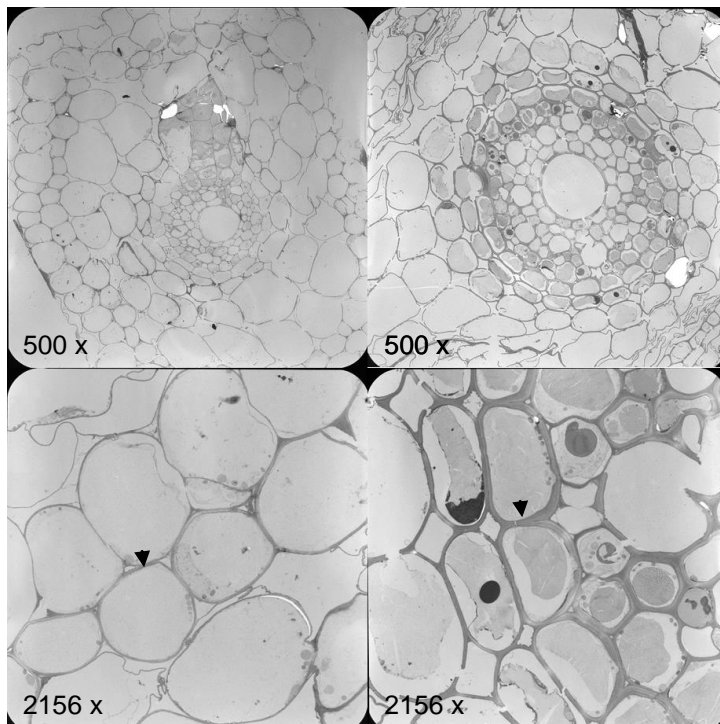
Abbildung 14: Physiologischer Effekt von Arsenat auf die Färbung von Reiswurzeln in Abwesenheit von Eisen

Reispflanzen wurden unter identischen Bedingungen in eisenfreiem Hoagland-Medium aufgezogen. Dargestellt sind Pflanzen, die zusätzlich für zwei Wochen mit 50 µM Arsenat behandelt wurden, und die unbehandelte Kontrolle.

Ein Teil der Pflanzen wurde zwei Wochen lang mit Arsen behandelt und zeigte auch unter diesen eisenfreien Bedingungen eine braune Verfärbung der Wurzeln (Abb. 14). Der Eisenmangel zeigte sich deutlich anhand der gelben Verfärbung der Blätter. Auch die arsenatinduzierte Inhibition des Spross- und Wurzelwachstums war wieder gut zu erkennen.

Das Herauslösen bzw. Isolieren der färbenden Substanz aus der Reiswurzel gestaltete sich als schwierig. Extraktionen mit Säuren, Basen, Hitze, hydrophilen und hydrophoben Lösungsmitteln, Protease-, DNase- und RNase-Verdau von gemörsertem in Stickstoff gefrorenem Wurzelmaterial waren allesamt erfolglos. Die einzige Möglichkeit, die Wurzeln zumindest zum Teil zu entfärben, war das Erwärmen in 1 M Natronlauge.

Dieser Verseifungsprozess beeinträchtigt jedoch die anschließende Analyse, da davon auszugehen ist, dass die färbenden Moleküle in ihrer Struktur verändert werden. Die verdünnte Natronlauge verfärbte sich nach dieser Behandlung bei den arsenbehandelten Wurzeln intensiv braun. In Abbildung 15 sind elektronenmikroskopische Bilder von Wurzelquerschnitten dargestellt. Die Wurzeln unbehandelter Pflanzen wurden denen von arsenbehandelten Pflanzen gegenübergestellt. Die Übersichtsaufnahmen und besonders die Vergrößerungen der arsenbehandelten Pflanzenwurzeln zeigten Veränderungen der Zellwand im Vergleich zur Kontrolle. Die Zellwände waren besonders bei den Zellen um die Leitgefäße in der Mitte verdickt. Die dunklen Erscheinungen in den Vakuolen konnten nicht endgültig identifiziert werden; es ist aber möglich, dass es sich um Metalloaggregate handelt, an denen die Elektronen des Elektronenmikroskops stark gestreut werden. Das würde bedeuten, dass größere Mengen eines Metalls oder Halbmetalls, z.B. Arsen, in den Vakuolen gelagert werden.



Kontrolle

Arsenat

Abbildung 15: Zelluläre Effekte von Arsenat im Wurzelgewebe von Reis

Dargestellt sind transmissionselektronenmikroskopische Querschnitte von Reiswurzeln, die zwei Wochen einer 50 μM Arsenatlösung ausgesetzt waren oder nicht intoxicifiziert wurden (Kontrolle). Die Übersichtsaufnahmen (oben) entsprechen einer 500fachen, die Detailaufnahmen einer 2156fachen Vergrößerung. Zellwände sind in der unteren Abbildung durch Pfeile markiert. Schnitte und Bilder wurden von Dr. York Stierhoff (ZMBP) hergestellt.

Um festzustellen, ob für die Zellwandverdickung phenolische Elemente oder Zelluloseablagerungen verantwortlich sind, wurden Wurzelquerschnitte mit Etzoldreagenz gefärbt. Bei der Etzold-Färbung erscheinen phenolische Komponenten rot und Zellulose blau. Die ungefärbten Wurzelquerschnitte von 7 Tage alten Pflanzen, die entweder unbehandelt blieben (Kontrolle) oder 3 Tage mit 50 μM Arsenat behandelt wurden, sind in Abbildung 16A dargestellt. Hier und in Abbildung 17A erkennt man den Unterschied zwischen der eigengefärbten arsenbehandelten Wurzel und der unbehandelten Wurzel. Bei dem durch den Pfeil markierten Sklerenchym ist die dunkle Eigenfärbung am stärksten. Wie bei den Querschnitten in Abbildung 17C zu sehen ist, wurde diese Verfärbung nach zweiwöchiger Arsenbehandlung noch deutlicher und weitete sich global auf den gesamten Cortex und die Endodermis aus. Die gleichen Wurzelschnitte wurden im Anschluss mit mit Etzoldreagenz angefärbt (Abb. 18). Auffällig war die leichte Rotfärbung bei den arsenbehandelten Wurzeln über den ganzen Schnitt. Im Vergleich mit der Kontrolle fiel auf, dass die Zellen der Endodermis eher eine blaue Färbung, zeigten (siehe Pfeile). In Abbildung 16C sind angefärbte Wurzelquerschnitte von Pflanzen gezeigt, die zwei Wochen lang mit Arsen behandelt wurden, sowie von der unbehandelten Kontrolle.

Die Kontrolle zeigte eine starke blaue Färbung (siehe Pfeil), die in Richtung Leitbündel ins Violette überging. Der arsenbehandelte Wurzelschnitt zeigte im gleichen Bereich eine Rotfärbung, die in Richtung Leitbündel ins Rotbraun überging und erst bei den Leitbündeln violett wurde.

Unbehandelte Pflanzen zeigen in ihren Wurzelquerschnitten einen höheren Zelluloseanteil (blaue Färbung) als die Querschnitte der arsenbehandelten Pflanzenwurzeln. Auf der anderen Seite überwiegt bei den behandelten Pflanzen die rote Färbung, die auf phenolische Komponenten schließen lässt.

Mittels Sudan III werden im Allgemeinen Lipide gefärbt, teilweise verwendet man diese Färbung auch, um erhöhte Mengen an Suberin zu detektieren (Abb. 17). Diese Färbung war nicht ganz eindeutig, da natürlich auch die Zellmembran der unbehandelten Pflanzen eine positive Färbung zeigte. Der gefärbte Wurzelquerschnitt der Kontrollen im Vergleich zum Querschnitt von drei Tage lang arsenbehandelten Pflanzen veranschaulichte dies (Abb. 17B). Auffällig war allerdings, dass selbst bei der verdickten Zellwand der behandelten Pflanzen die komplette Zellwand gefärbt wurde. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass die Zellwandverdickung zumindest zum Teil durch die Deposition von lipophilen Substanzen mit verursacht wird. Auch bei dem Wurzelquerschnitt von einer zwei Wochen lang mit Arsen behandelten Pflanze zeigte sich eine intensivere Färbung als bei der Kontrolle (Abb. 17C).

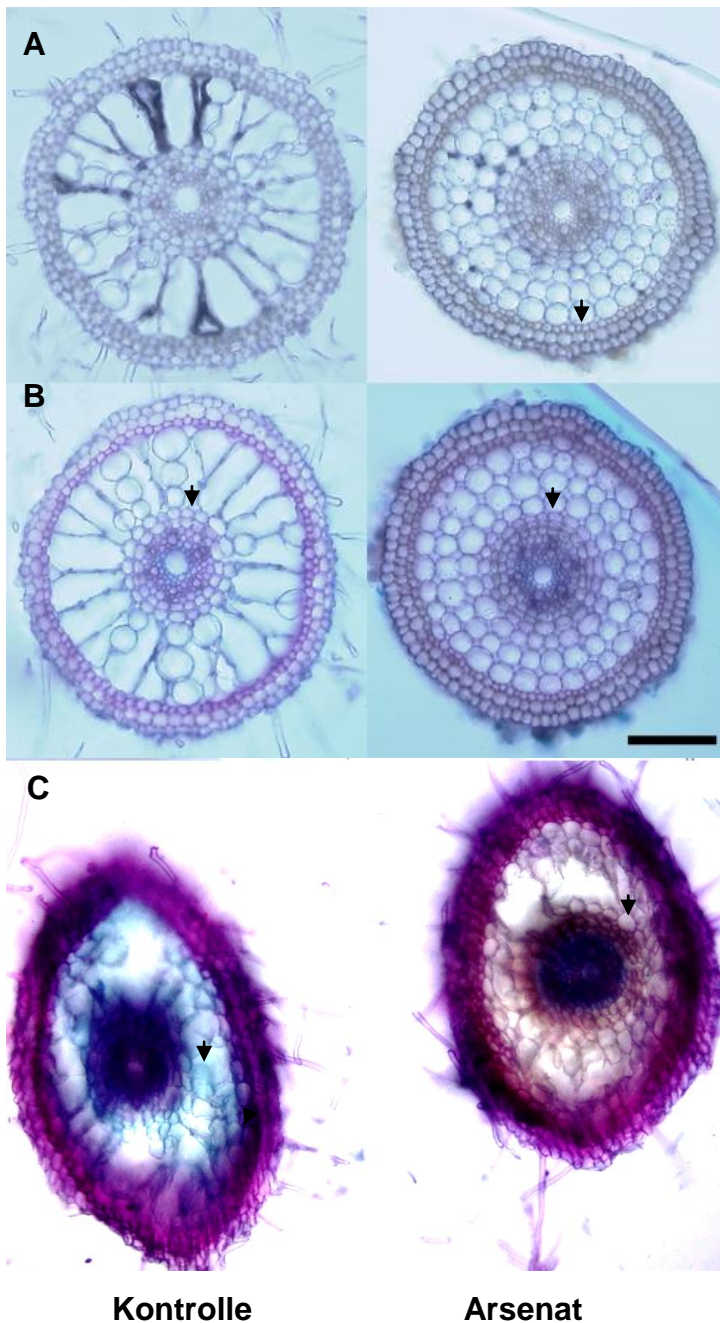


Abbildung 16: Effekt von Arsenat auf die Akkumulation von Zellulose und phenolischen Komponenten im Wurzelgewebe von Reis (Etzold-Färbung)

Gezeigt sind lichtmikroskopische Querschnitte von Reiswurzeln in 200facher Vergrößerung. Die Pflanzen wurden drei Tage (A-B) oder zwei Wochen (C) einer 50 μM Arsenatlösung ausgesetzt oder sie wurden nicht intoxiciert (Kontrolle). Die Schnitte blieben entweder unbehandelt (A) oder wurden für 10 min mit Etzold-Reagenz gefärbt (B-C). Das Etzold-Reagenz färbt Zellulose blau und phenolische Komponenten rot. Größenbalken in B: 100 μm .

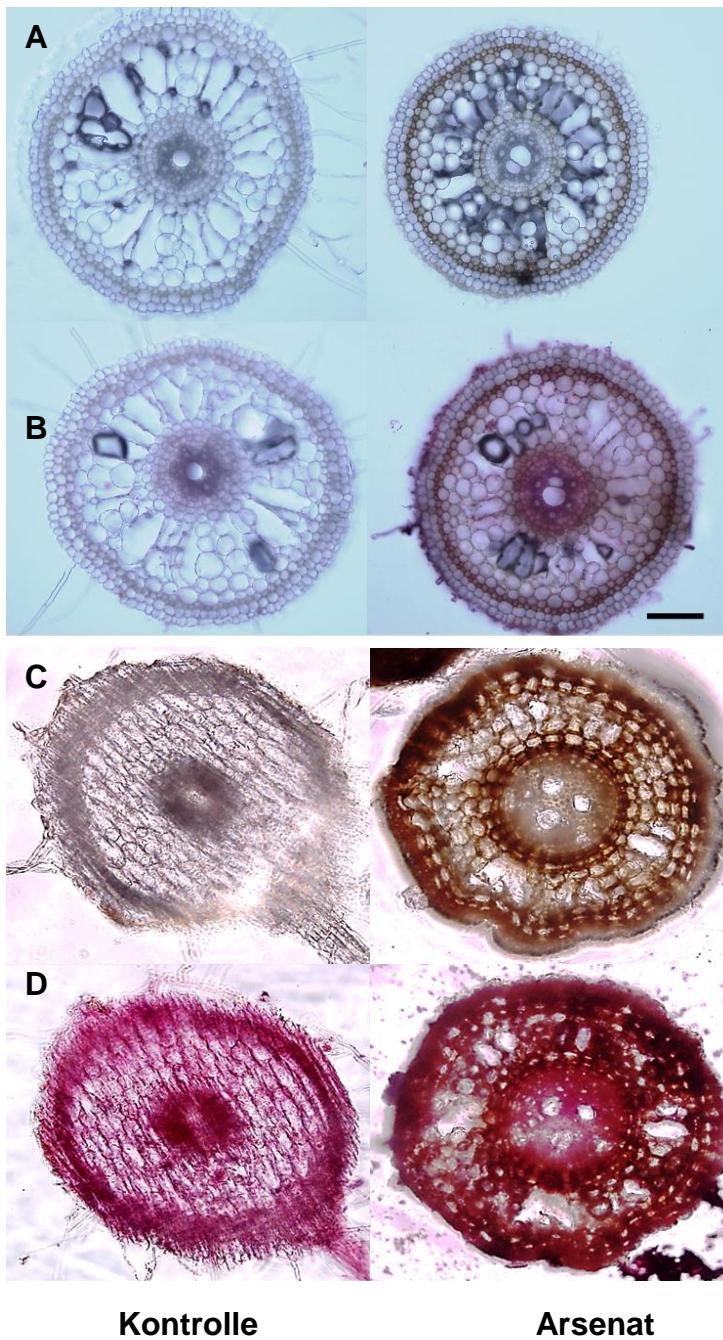


Abbildung 17: Effekt von Arsenat auf lipophile Komponenten im Wurzelgewebe von Reis (Sudan-III-Färbung)

Gezeigt sind lichtmikroskopische Querschnitte von Reiswurzeln in 200facher Vergrößerung. Die Pflanzen wurden drei Tage (A-B) oder zwei Wochen (C-D) einer 50 μM Arsenatlösung ausgesetzt oder sie wurden nicht intoxifiziert (Kontrolle). Die Schnitte blieben entweder unbehandelt (A und C) oder wurden für 30 min mit Sudan-III-Färbelösung gefärbt und anschließend erwärmt (B und D). Sudan-Farbstoffe binden Lipide und zeigen dann eine kräftige rote Färbung. Größenbalken in B: 100 μm .

Die andere wichtige phenolische Verbindung in der Zellwand ist Lignin. Eine Färbung für Lignin (mittels Phloroglucinlösung) wurde durchgeführt und zeigte keine Ergebnisse (Abb. 18). Auch das Färben der Wurzelquerschnitte von Pflanzen, die eine Woche lang dieser Arsenatkonzentration ausgesetzt waren, zeigte keine Veränderung (nicht gezeigt).

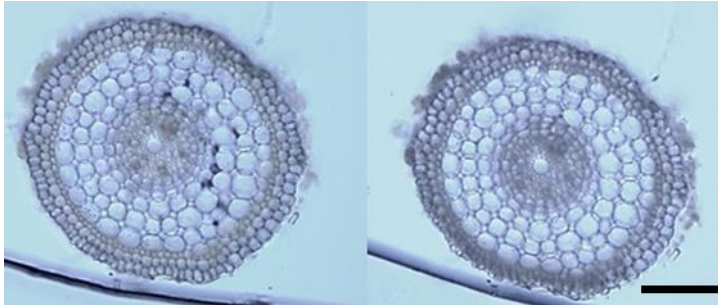


Abbildung 18: Effekt von Arsenat auf die Ligninbildung im Wurzelgewebe von Reis (Phloroglucin-Färbung)

Gezeigt sind lichtmikroskopische Querschnitte in 200facher Vergrößerung einer Reiswurzel. Die Pflanzen wurden drei Tage einer 50 μM Arsenatlösung ausgesetzt. Im Bild links ist ein ungefärbter Wurzelquerschnitt zu sehen, rechts der gleiche Wurzelquerschnitt nach 30 min Inkubation in der Phloroglucin-Färbelösung. Die Pflanzen, die für diese Schnitte Verwendung fanden, waren eine Woche alt. Größenbalken in B: 100 μm .

5.3 Metabolomik: Die Veränderungen von Metaboliten des Zucker-, Aminosäure- und Sekundärstoffwechsels in arsenbehandelten Reiswurzeln

Es wurde eine quantitative Untersuchung der Metaboliten arsenbehandelter Reiswurzeln durchgeführt, um zu sehen, inwieweit sie sich von den Proben unbehalteter Reiswurzeln unterscheiden. Für eine quantitative Untersuchung muss allerdings die Zuordnung der gesuchten Metabolite zu ihrer Retentionszeit und Masse schon im Voraus erfolgt sein. Daher kann nicht jeder beliebige Metabolit quantifiziert werden, sondern nur solche, die schon zuvor (z.B. mittels Referenz) bei gleicher Probenvorbereitung zugeordnet werden konnten. Auch um der Ursache der Wurzelverfärbung weiter auf den Grund zu gehen, wurden die Veränderungen einiger spezifischer Metabolite unter Arsenstress untersucht. Dies ist bei Zellwandkomponenten aufgrund der stark verzweigten Molekülstruktur und der variierenden Zusammensetzung allerdings sehr schwierig; aber auch die indirekte Messung der Vorstufen phenolischer Verbindungen wie Shikimisäure und Phenylalanin oder Zucker wie Glukose kann in diesem Zusammenhang wertvolle Hinweise liefern. Auch um später das durch die quantitative Proteomik erhaltene Bild zu komplettieren, war ein quantitativer Metabolomikansatz von Nutzen. Dabei lag der Schwerpunkt auf einigen Metaboliten des Citratzyklus', des Zucker- und des Aminosäurestoffwechsels so wie Intermediaten des Sekundärmetabolismus'. Verglichen wurden die Wurzeln von drei Wochen alten unbehalteten Reispflanzen mit den Wurzeln

von zwei Wochen alten Pflanzen, die eine Woche lang 10 bzw. 100 μM Arsenat ausgesetzt waren. Diese Bedingungen wurden gewählt, da sie denjenigen in der Veröffentlichung von Mühe und Kollegen [28] entsprechen, so dass man die erhaltenen Daten hinsichtlich der applizierten Arsenkonzentration, Wurzel- und Sprosslänge und Expression der Phosphattransporter in Bezug setzen konnte.

In den Abbildungen zu diesen Metabolom-Untersuchungen sind nur Daten dargestellt, die einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufweisen. Fehlende Balken bedeuten also, dass der p-Wert dieser Daten größer als 0,05 ist und nicht, dass der Unterschied nicht existiert. Zur besseren Übersicht sind die Daten dieser absoluten Quantifizierung als relative Quantifizierung dargestellt. Auf diese Weise können zusammengehörige Metabolite in einem Diagramm verglichen werden. Die Daten der absoluten Quantifizierung sind im Anhang in Tabelle 3 zu finden.

In Abbildung 19 sind die Veränderungen von denjenigen Metaboliten aus den Wurzeln dargestellt, die nicht direkte Produkte der primären Stoffwechselwege sind. Malonsäure ist für die Fettsäure-Synthese als Malonyl-CoA wichtig, kann als Malonsäure allerdings auch gut als Succinat-Dehydrogenase-Inhibitor fungieren. Es handelt sich um den einzigen Metaboliten, der bei der Messung in den behandelten Proben in geringerer Menge vorhanden war als in der Kontrolle. Eine erhöhte Menge in den behandelten Pflanzen wurde dagegen im Falle von *myo*-Inositol, Shikimisäure und Threonsäure gefunden (Abb. 19). *myo*-Inositol ist ein Abbauprodukt des normalerweise mit Fettsäuren veresterten Phosphatspeichers der Pflanze; hierbei werden die verschiedenen Hydroxylgruppen des Inositols mit Phosphaten verestert. *myo*-Inositol kann allerdings auch ein Beiprodukt der Raffinosesynthese sein. Die Shikimisäure ist die Vorstufe für alle Lignin-Monomere, kann aber auch als Zwischenprodukt vieler anderer Sekundärmetabolite dienen, darunter so bedeutsame wie Suberin, Cumarin oder Flavonoide. Die Threonsäure ist ein Abbauprodukt der Ascorbinsäure und somit unmittelbar mit dem Redoxstoffwechsel verbunden.

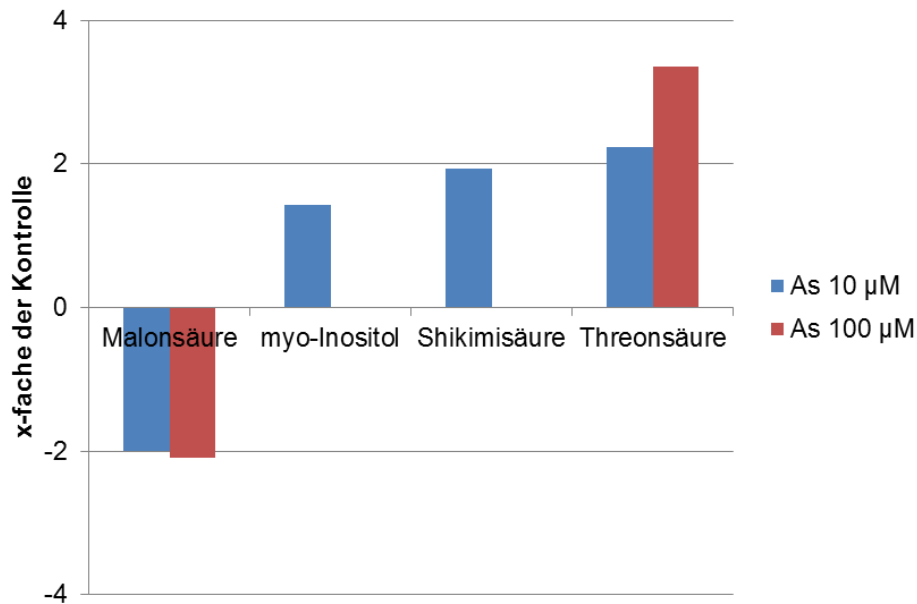


Abbildung 19: Effekt der Arsenatbehandlung auf die relative Menge von Shikimisäure (zentraler Metabolit des Sekundärstoffwechsels), Malonsäure, *myo*-Inositol (Abbau- und Zwischenprodukte des Phosphat- und Lipidstoffwechsels) und Threonsäure (Produkt des Ascorbatabbaus und damit Marker des Redoxstoffwechsels) in Reisswurzeln

Drei Wochen alte Reispflanzen wurden für eine Woche mit 10 bzw. 100 µM AsO_4^{3-} behandelt. Die Metabolite in den Wurzelextrakten wurden mittels GC/MS quantifiziert. Es sind nur die Metabolite dargestellt, deren Konzentration von der unbehandelten Kontrolle signifikant verschieden ist (p-Wert < 0,05). Die fehlenden roten Balken in diesem Balkendiagramm bei *myo*-Inositol bzw. Shikimisäure zeigen an, dass sich unter diesen Bedingungen die gemessenen Mengen dieser Metaboliten nicht signifikant von der Kontrolle unterscheiden.

Die als signifikant gewerteten Zucker wurden in den behandelten Proben in höheren Mengen gefunden als in der Kontrolle (Abb. 20). Sie können grundsätzlich der Energiegewinnung dienen wie etwa die Saccharose, die Raffinose und die Trehalose. Durch den Transport dieser Zucker zu anderen Geweben kann der Energiebedarf innerhalb der Pflanze reguliert und ausgeglichen werden. Zur Synthese von Raffinose werden außerdem Galactinol und Saccharose benötigt, das Nebenprodukt ist hierbei der Polyalkohol *myo*-Inositol (Abb. 19).

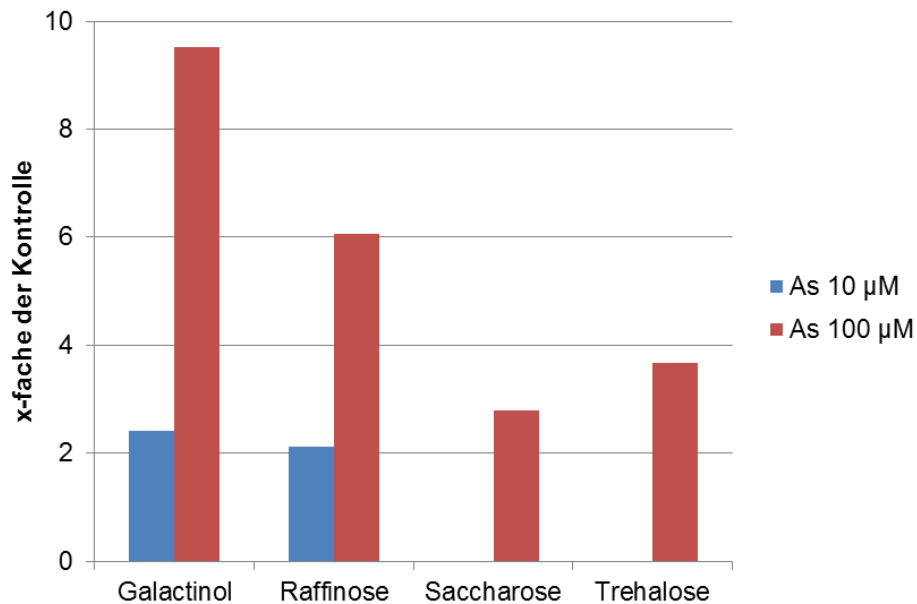


Abbildung 20: Effekt der Arsenatbehandlung auf die relative Menge ausgewählter Disaccharide (Saccharose, Trehalose), eines Trisaccharid (Raffinose) und eines Zuckeralkohols (Galactinol) in Reiwurzeln

Drei Wochen alte Reispflanzen wurden für eine Woche mit 10 bzw. 100 µM AsO_4^{3-} behandelt. Die Metabolite in den Wurzelextrakten wurden mittels GC/MS quantifiziert. Es sind nur die Metabolite dargestellt, deren Konzentration in den behandelten Proben signifikant verändert ist (p -Wert < 0,05). Die fehlenden blauen Balken in diesem Balkendiagramm bei Saccharose bzw. Trehalose zeigen an, dass sich unter diesen Bedingungen die gemessenen Mengen dieser Metaboliten nicht signifikant von der Kontrolle unterscheiden.

Es konnten Änderungen bei der Akkumulation einiger Aminosäuren im Wurzelgewebe von arsenbelasteten Pflanzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpflanzen gemessen werden (Abb. 21). Die schwefelhaltige Aminosäure Cystein wurde unter Arsenstress besonders stark akkumuliert. Als Baustein von Molekülen wie Glutathion, Phytochelatinen und Thioredoxin spielt Cystein eine wichtige Aufgabe in der Bewältigung von oxidativem Stress oder bei der Entgiftung von Schwermetallen. Cystein ist aber auch Bestandteil der aktiven Zentren von Enzymen wie der Pyruvat-Dehydrogenase und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, darüber hinaus dienen Cysteinreste der Koordination von Eisen-Schwefel-Clustern in Proteinen.

Sowohl von L-Tyrosin als auch von L-Phenylalanin wurden im Vergleich zur Kontrolle bei beiden Arsenatkonzentrationen größere Mengen detektiert. L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Phenylalanin sind Aminosäuren, die über den Shikimisäureweg synthetisiert werden. Vom Phenylalanin leiten sich wiederum die Monomere des Lignins und die phenolischen Komponenten des Suberins ab. Betrachtet man die Rohdaten von L-Tryptophan (siehe Tab. 3), fällt auf, dass auch hier die Konzentration erhöht war. Durch die geringe Anzahl an Messwiederholungen, die starken Schwankungen zwischen den Proben und die geringe Konzentration dieser Aminosäure sind die erhaltenen Daten allerdings statistisch nicht signifikant.

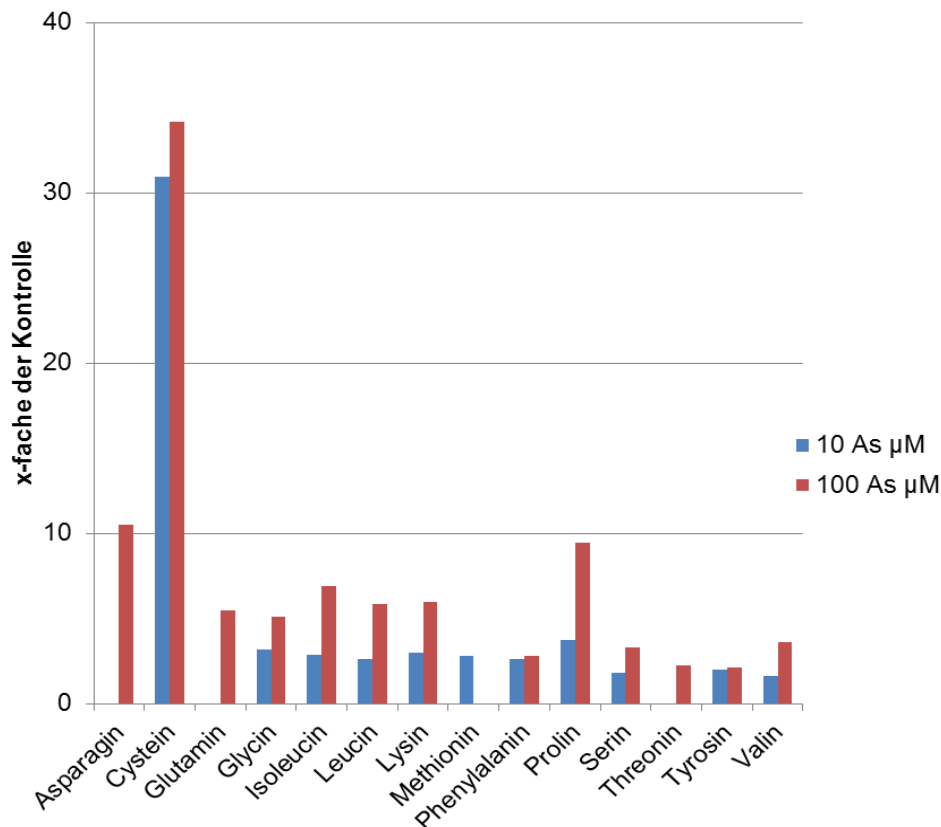


Abbildung 21: Effekt der Arsenatbehandlung auf die relative Menge ausgewählter aliphatischer Aminosäuren (Glycin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Prolin und Valin), aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin), amidierter Aminosäuren (Asparagin, Glutamin), schwefelhaltiger Aminosäuren (Cystein, Methionin), hydroxylierter Aminosäuren (Serin, Threonin, Tyrosin) und einer basischen Aminosäure (Lysin) in Reiswurzeln.

Drei Wochen alte Reispflanzen wurden für eine Woche mit 10 bzw. 100 µM AsO_4^{3-} behandelt. Die Metabolite in den Wurzelextrakten wurden mittels GC/MS quantifiziert. Es sind nur die Metabolite dargestellt, deren Konzentration von der unbehandelten Kontrolle signifikant verschieden ist (p -Wert < 0,05). Die fehlenden blauen und roten Balken in diesem Balkendiagramm bei Asparagin, Glutamin, Methionin und Threonin zeigen an, dass sich unter diesen Bedingungen die gemessenen Mengen dieser Metabolite nicht signifikant von der Kontrolle unterscheiden.

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, wurden keine signifikanten Veränderungen in der Quantität für Metabolite des Citratzyklus' wie der Fumarsäure, der Bernsteinsäure (Succinylsäure) oder der Zitronensäure gemessen. Auch die Brenztraubensäure (Salz ist das Pyruvat), die Äpfelsäure (Salz ist das Malat) oder die α -Ketoglutar Säure waren in gleicher Menge in dem behandelten Gewebe vorhanden wie in den unbehandelten Kontrollen. Aber auch die Milchsäure, die bei der Umsetzung von Pyruvat bei anaeroben Bedingungen angereichert werden würde, blieb bei einer Arsenatbehandlung in der Menge unverändert, ebenso wie die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose (Anhang Tab. 3).

5.4 Proteomik: Die Veränderungen der Proteinmengen durch Arsenbehandlung

Für ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge bei einer Arsenvergiftung in der Pflanze ist es wichtig, einen Überblick über die verursachten Änderungen zu erhalten. Dabei ist die Transkriptomanalyse meist das Mittel der Wahl. Allerdings ist es wichtig, nicht nur die die Transkripte zu betrachten, sondern auch die resultierenden Produkte (Proteine). Die quantitative Betrachtung von Proteinen ist ein weiterer Schritt, der dazu beitragen kann, die durch Arsenat induzierten Veränderungen zu verstehen, da bei der alleinigen Betrachtung der RNA verschiedene posttranskriptionale Regulationsmechanismen und die Degradation von Proteinen nicht erfasst werden können.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war, die bestehenden Methoden, die für *Arabidopsis* mehr oder weniger etabliert sind, auf Reis zu übertragen. Veröffentlichungen zur Proteomik arsenatbehandelter Reispflanzen liegen kaum vor. In den wenigen vorhandenen Veröffentlichungen wurden die Proteine mittels 2D-Gelen aufgetrennt und ausgeschnitten, um sie anschließend zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde hingegen eine Methode verwendet und angepasst, die es ermöglicht, ohne die vorherige Auftrennung der Proteine auf einem Gel auszukommen. Zusammen mit der Isotopenmarkierung erlaubt es diese Methode, wesentlich mehr Proteine in kurzer Zeit zu quantifizieren, da die Quantifizierung ohne weitere Arbeitsschritte gleichzeitig mit der Identifizierung geschieht. Zunächst musste allerdings ein Großteil der Arbeitsschritte für Reis angepasst werden. Dazu zählten das Markieren der Proteine mittels ^{15}N , die Hydrokultur der Reispflanzen, die anschließende Präparation der Proben, die Isolation der Proteine, die Messung mittels ESI-MS/MS und zuletzt das Prozessieren der Daten.

Da besonderes Interesse an regulatorischen Elementen im Kern und epigenetischen Effekten von Arsenat sowie Änderungen im Energiehaushalt bestand und somit an den Proteinen in den Mitochondrien, wurde der Proteinisolation eine Kern- und Zellorganellen-Anreicherung vorangestellt. Änderungen im Energiehaushalt wurden zwar immer vermutet, bis *dato* aber noch nie *in vivo* gezeigt. Epigenetische Effekte sind lediglich bei einer Langzeitexposition bei Menschen bekannt. Eine Langzeitbehandlung der Reispflanzen wurde durchgeführt, da bei einer geringen Arsenkonzentration wie 25 μM die Effekte auf die Pflanze natürlich zunächst geringer sind als bei höheren Konzentrationen. Allerdings ist nicht nur die Arsenmenge ausschlaggebend, sondern auch die Expositionsdauer. Auf diese Weise konnten Bedingungen getestet werden, die einer natürlichen Arsenexposition ähnlicher sind als eine kurze Behandlung mit Arsenatkonzentrationen, die in der Natur nicht vorkommen. Auch und gerade um epigenetische Veränderungen zu beobachten, war eine Exposition über einen längeren Zeitraum notwendig.

5.4.1 Ideale Datenverteilung der quantifizierten Proteine bei der Gegenüberstellung reziproker Messungen

Um die komplexen Zusammenhänge, die durch das Markieren und Behandeln unterschiedlicher Pflanzen und das anschließende Mischen dieser Gewebe entstehen, klarer darzustellen, soll im Anschluss zunächst der theoretische Idealfall besprochen werden, also das theoretisch ideale Verhalten der Daten bei der Gegenüberstellung der reziproken Messungen und den im gleichen Diagramm dargestellten Kontrollen. Auf diese Weise wird die Interpretation der Gegenüberstellung reziproker Messungen in den Abbildungen 23-25 vereinfacht.

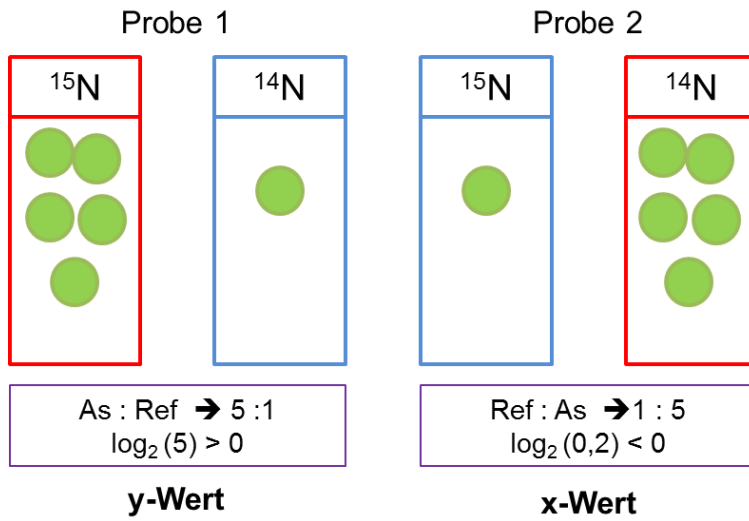
Aus technischen Gründen werden bei Proteomanalysen wie den hier durchgeführten nicht die Vollängen-Proteine quantifiziert und identifiziert. Proteine werden vor dem Messen durch Proteasen gespalten. Die aus diesem Verdau erhaltenen Peptide werden dann aufgetrennt und für die Identifizierung und Quantifizierung verwendet. Daher müssen in allen Messungen die Peptide, die zur Quantifizierung verwendet werden, eindeutig einem Protein zugeordnet werden können. Idealerweise beschreiben daher mehrere proteinspezifische Peptidsequenzen ein Protein. Aus den Werten für die Quantifizierung dieser Peptide wird dann für jedes Protein pro Messung der Mittelwert gebildet.

In dem Fall lassen sich durch Vereinen von nicht mit Arsen behandeltem Pflanzenmaterial (Referenz) und behandeltem Pflanzenmaterial und dem Einsatz unterschiedlicher Stickstoffisotope die einzelnen Peptide quantifizieren, indem man das Verhältnis von ^{15}N -Peptid zu ^{14}N -Peptid bestimmt. Außerdem lassen sich auf diese Weise reziproke Proben herstellen, bei denen einmal die Referenzproteine mit ^{15}N markiert werden und einmal die der behandelten Pflanzen.

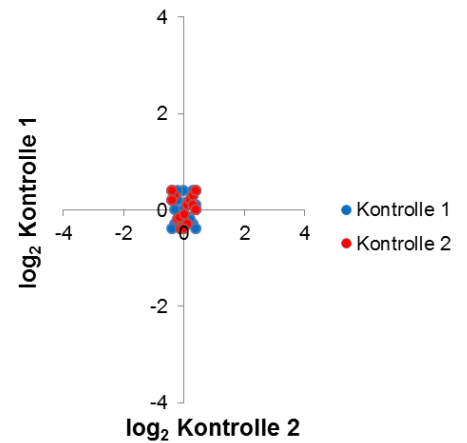
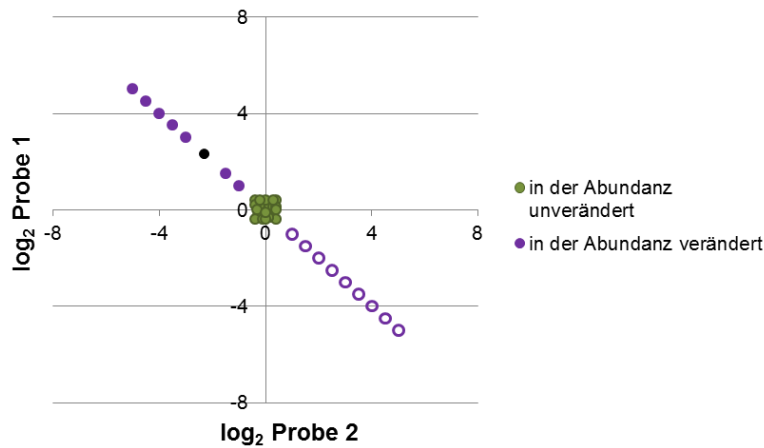
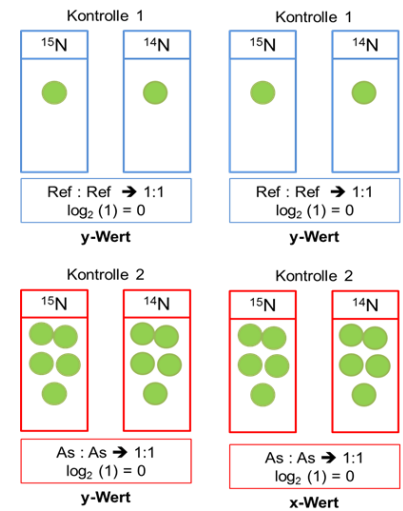
Betrachtet man bei der Gegenüberstellung der reziproken Messungen ausschließlich in ihrer Abundanz veränderte Proteine, entsteht im Idealfall eine Funktion wie in Abbildung 22 dargestellt. Bei einer Veränderung sollten sich die Punkte idealerweise auf einer 45° -Achse bewegen. Ist die Veränderung durch die Behandlung bedingt, sollten x und y zueinander die Bedingung $x = -y$ erfüllen.

Um die Messungengenauigkeiten abschätzen zu können, wurde außer der internen Referenz eine weitere Form der Kontrolle verwendet. Hierbei wurde Pflanzenmaterial von sowohl mit ^{15}N markierten als auch unmarkierten Pflanzen (^{14}N) gemischt, die nicht mit Arsenat behandelt wurden (Kontrolle 1). Da diese Probenmaterialien einander bis auf die Markierung entsprechen sollte, ist im Idealfall ein ^{15}N -Protein- zu ^{14}N -Protein-Verhältnis von 1:1 zu erwarten. Eine weitere Kontrolle bestand aus der Mischung von sowohl ^{15}N -markiertem als auch unmarkierten Pflanzenmaterial (^{14}N) von mit Arsenat behandelten Pflanzen (Kontrolle 2). Auch hier gilt das gleiche wie für Kontrolle 1, im Idealfall ist ein Verhältnis von ^{15}N -Protein zu ^{14}N -Protein von 1:1 zu erwarten. Die Kontrollen würden sich im Idealfall um den Ursprung anordnen.

1. Reziproke Proben



2. Kontrolle



AsO₄³⁻ Behandlung



Referenz



Protein (ist erhöht bei Arsenbehandlung)

Abbildung 22: Konzeption zur idealen Datenverteilung quantifizierter Proteine von reziproken Messungen

In diesem Fallbeispiel soll die Proteinmenge von dem betrachteten Protein (grüner Punkt) bei Arsenbehandlung (roter Rahmen) erhöht sein, im Gegensatz zur unbehandelten Referenz (blauer Rahmen). Reziproke Proben: In dem hier beschriebenen Beispiel ist das grüne Protein in der behandelten Probe 5fach erhöht. Damit entsteht für Probe 1 ein Verhältnis (¹⁵N-Protein zu ¹⁴N-Protein) von 5:1, da hier behandeltes ¹⁵N-markiertes Pflanzenmaterial mit unbehandeltem ¹⁴N-Pflanzenmaterial (Referenz) gemischt wurde. Für die zur Probe 1 reziproke Probe 2 ergibt sich also für das gleiche Protein ein Verhältnis von 1:5. Im Idealfall sollte also das Auftragen der log₂-Werte von mehreren Proteinen von Probe 1 gegen die entsprechenden log₂-Werte von Probe 2 eine Funktion $y = -x$ ergeben. Dies ist in der Funktion unten links dargestellt. Der in dieser Funktion schwarz dargestellte Punkt würde dabei das Protein aus dem Fallbeispiel darüber darstellen. Die lila Punkte entlang einer 45°-Achse (zur x-Achse) stellen weitere

theoretische Proteine dar, die bei Arsenstress ebenfalls eine erhöhte Abundanz zeigen. In dem Bereich, in dem die y-Werte ein negatives Vorzeichen besitzen, sind Punkte dargestellt, die nicht gefüllt sind. Daten in diesem Bereich stammen von Proteinen, die unter Arsenstress in der Menge in Vergleich zur Referenz reduziert sind. Die grünen Punkte stellen Proteine dar, die sich in ihrer Abundanz durch die Behandlung nicht ändern.

Kontrollen: In den Kontrollen sollte durch Gleichbehandlung der Pflanzen ein Verhältnis von 1:1 bestehen, wie auf der rechten Seite der Konzeption dargestellt wird.

Dies gilt sowohl für den Fall, dass die jeweiligen Referenzen gemischt werden (Kontrolle 1, blaue Punkte) als auch für den Fall, dass behandeltes Pflanzenmaterial miteinander gemischt wird (Kontrolle 2, rote Punkte). Da ein Verhältnis (^{15}N -Protein zu ^{14}N -Protein) von 1:1 einen Wert von 1 ergibt und damit der \log_2 -Wert 0 beträgt, sollten sich die Kontrollpunkte um den Ursprung darstellen.

5.4.2 Reale Datenverteilung der quantifizierten Proteine bei der Gegenüberstellung reziproker Messungen

Der oben beschriebene Idealfall wäre aber nur zu beobachten, wenn es keine Messungenauigkeiten gäbe und keine Schwankungen bei den Wachstumsbedingungen der Pflanzen und der Aufarbeitung der Proben. Daher ergaben sich Datenpunkte, bei denen die Werte der reziproken Messungen beide positiv oder beide negativ waren. Sowohl in den Kontrollen als auch in den Proben waren solche Datenpunkte (mit gleichem Vorzeichen) auf die oben genannten Ursachen zurückzuführen. Die Kontrollen, die in diesen Diagrammen gegeneinander aufgetragen sind, wuchsen zur gleichen Zeit und unter den gleichen Bedingungen auf wie die behandelten Pflanzen, daher sollten sie auch den gleichen Schwankungen ausgesetzt gewesen sein. Durch die Schwankungen zeigt sich – anstelle der idealen Anordnung der Kontrolldaten um den Ursprung – eine Anordnung entlang der Funktion $x = y$.

Durch das Auftragen der reziproken Experimente und der Kontrollen konnte eine erste Einschätzung der Qualität der Daten erfolgen. Da immer reziproke Messungen und die Kontrolle aufgetragen werden müssen, sind mindestens 6 Messungen notwendig: Die Messungen der beiden reziproken Proben (Probe 1 und Probe 2), zwei Messungen der unbehandelten Kontrollen (Kontrolle 1) und zwei Messungen der behandelten Kontrollen (Kontrolle 2). Durch Auftragen der Kontrollen und der reziproken Messungen können gerade um den Ursprung herum die Grenzen ermittelt werden, ab denen sich diese voneinander unterscheiden. Ebenso wie die Kontrollen sollten in der Abundanz unveränderte Proteine theoretisch genau im Ursprung lokalisiert sein. Da dies, wie schon bei den Kontrollen erwähnt, nicht realistisch ist, zeigten die Kontrollmessungen an, wie groß diese zu erwartenden und unvermeidlichen Abweichungen vom Ursprung sind. Dadurch wird schlussendlich deutlich, wo die Grenzen zwischen Messungenauigkeit und tatsächlicher Veränderung durch die Behandlung liegen.

5.4.3 Gegenüberstellung der reziproken Messungen

Nachdem das Prinzip und das Verhalten der Daten bei der Gegenüberstellung zweier reziproker Messungen beschrieben wurde, sollen die Graphen für die gemessenen Daten dargestellt und besprochen werden. In Abbildung 23 bis 25 sind diese Gegenüberstellungen mit den entsprechenden Kontrollen abgebildet.

5.4.3.1 Gegenüberstellung der reziproken Messungen von Proteinen aus Reiswurzeln nach Langzeitbehandlung mit Arsenat

In Abbildung 23 sind \log_2 -Werte der beiden reziproken Messungen für die Wurzeln von langzeitbehandelten Pflanzen zusammen mit den dazugehörigen Kontrollen gegeneinander aufgetragen. Die Langzeitbehandlung war eine Behandlung der ganzen Pflanze in hydroponischer Kultur mit 25 μM Arsenat über 7 Wochen. Betrachtet man Abbildung 23 genauer, sieht man die Abgrenzung zwischen den beiden Kontrollen (blau) und den gegeneinander aufgetragenen reziproken Messungen (rot). Man erwartet bei einer quantitativen Messung wie dieser, dass sich der Großteil der Proteine trotz der Behandlung nicht in seiner Abundanz verändert, sondern eine spezifische Reaktion auf die Behandlung ausgelöst wird. Die Punkte, die diese in der Abundanz unveränderten Proteine darstellen, sind in diesem Diagramm unter den in Blau dargestellten Kontrollen verborgen. Für die Darstellung heißt das, dass alle sichtbaren roten Punkte für Proteine stehen, deren Abundanz durch Arsen verändert wurde. Ob dieser Unterschied zu den Kontrollen allerdings signifikant ist, kann erst durch eine statistische Analyse ermittelt werden, wie sie in Material und Methoden (Abschnitt 5.9) beschrieben ist. Alle Proteine, die einen signifikanten Unterschied zeigen, sind in Tabelle 2 im Anhang mit ihren p-Werten aufgeführt.

Legt man eine Trendlinie für eine lineare Funktion durch die Daten der reziproken Messungen, dann hat diese die Funktion $y = -0.9135x$. Das bedeutet also, dass die Daten ziemlich genau den Erwartungen, die aus dem Idealfall resultieren ($y = -x$), entsprechen.

Zur besseren Beschreibung wurde das Koordinatensystem in die üblichen Quadranten unterteilt, dabei teilen x- und y-Achse das System in vier Quadranten. Quadrant I ist dabei der Bereich oben rechts und die weiteren drei Quadranten wurden gegen den Uhrzeigersinn mit römischen Zahlen nummeriert.

Das Diagramm zeigt außerdem, in welche Richtung die Abundanz der Proteine verändert war. So sind Datenpunkte der reziproken Messungen, die nicht von den Kontrollen verdeckt werden, im Quadrant II höher exprimiert als in der Referenz und im Quadrant IV niedriger exprimiert. Es zeigt sich also für diesen Datensatz, dass die Anzahl an Proteinen, die vermehrt exprimiert wurden, und die Anzahl derer, die weniger abundant waren, sich weitgehend entsprechen. Es ist lediglich ein Unterschied in der Stärke dieser Änderung zu

erkennen. So sind die Werte nur weniger in der Abundanz herunterregulierter Proteine größer als zwei, während für die stärker exprimierten Proteine einige diese Grenze überschreiten.

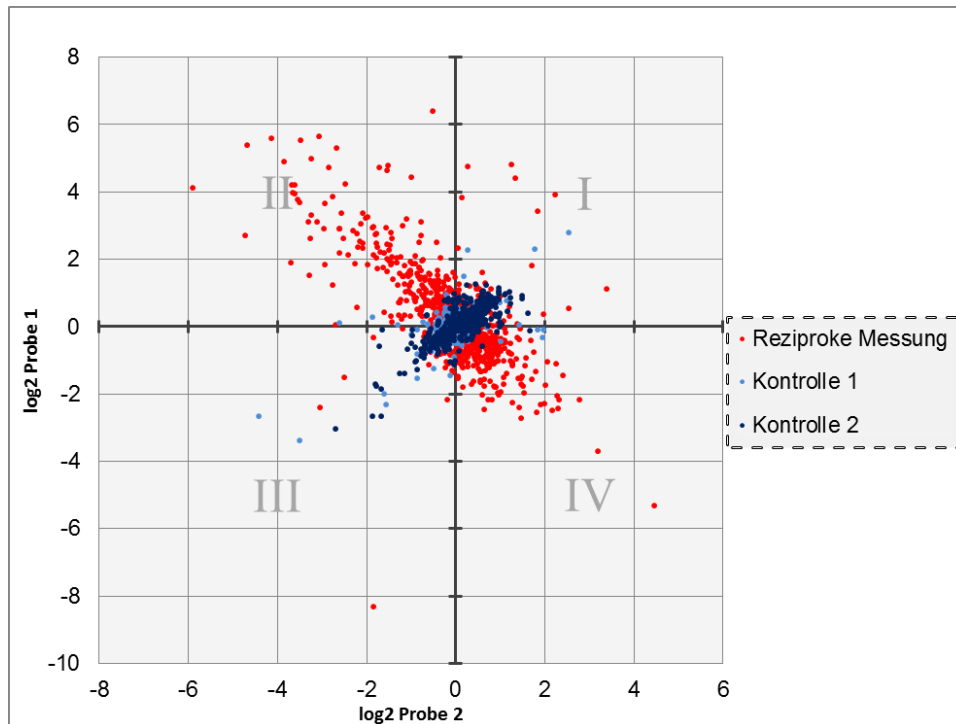


Abbildung 23: Reziproke Messungen von Wurzeln 56Tage alter Reispflanzen, die entweder für 49 Tage 25 μM Arsenat ausgesetzt waren oder unbehandelt blieben

Auf der x-Achse sind die \log_2 -Werte der Probe 2, auf der y-Achse die Werte der Probe 1 aufgetragen (in Rot dargestellt). Kontrolle 1 ist hier in Hellblau dargestellt. Kontrolle 2 ist in Dunkelblau dargestellt. (Zur Zusammensetzung dieser Proben und Kontrollen, vgl. Abb. 7)

Das Koordinatensystem ist in vier Quadranten eingeteilt (graue römische Zahlen). Datenpunkte in Quadrant I und III repräsentieren veränderte Proteinmengen, die aus veränderten Wachstums- oder Messbedingungen resultieren. Datenpunkte in Quadrant II repräsentieren eine Erhöhung der Abundanz im Vergleich zur Kontrolle, die von der Arsenatbehandlung ausgelöst wurde. Die Datenpunkte, die in Quadrant IV zu sehen sind, repräsentieren Proteine, deren Abundanz arsenabhängig verringert ist.

5.4.3.2 Gegenüberstellung Gegenüberstellung der reziproken Messungen von Proteinen aus Reissprossen nach Langzeitbehandlung mit Arsenat

Abbildung 24 zeigt Proben, die von den gleichen Pflanzen gewonnen wurden wie die zuvor beschriebenen Wurzelproben. Allerdings wurden die Proteinextrakte in diesem Fall ausschließlich von den Sprossen gewonnen. Auch hier zeigen sich bei einigen Proteinen eine Veränderung in der Menge durch die Behandlung. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich allerdings, dass die Werte, um die sich die Proteinmengen änderten, sehr viel geringer waren als in den Wurzeln, wie der geringere Abstand dieser Daten zum Ursprung zeigt. Die statistische Auswertung ergab, dass zwar signifikante durch die Behandlung

bedingte Veränderungen vorhanden waren, aber diese Organe weit weniger betroffen waren als die Wurzeln. Schon allein durch die geringere Anzahl an in der Abundanz veränderten Proteinen zeigt sich auch kein Muster in Form einer zugrundeliegenden Funktion, wie es bei den Wurzelproben der Fall ist (Abb. 24).

Wenn man die Quadranten II und IV betrachtet, erkennt man auch, dass wesentlich mehr Proteine in ihrer Menge herunter- als hochreguliert sind.

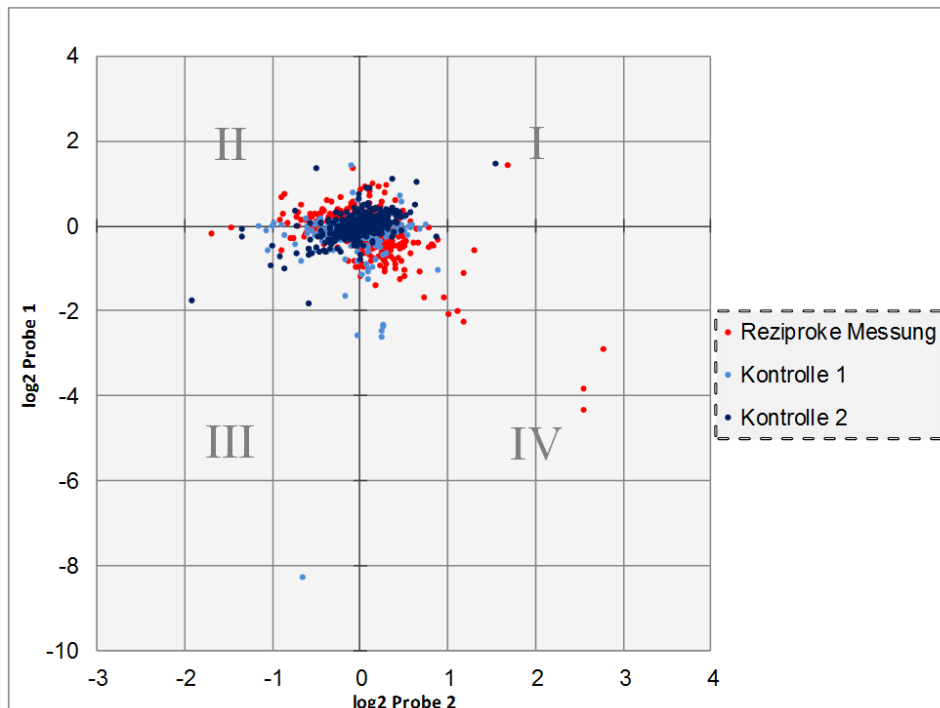


Abbildung 24: Reziproke Messungen von Sprossen 56 Tage alter Reispflanzen, die entweder für 49 Tage 25 μM Arsenat ausgesetzt waren oder unbehandelt blieben

Auf der x-Achse sind die \log_2 -Werte der Probe 2, auf der y-Achse die Werte der Probe 1 aufgetragen (in Rot dargestellt). Kontrolle 1 ist hier in Hellblau dargestellt. Kontrolle 2 ist in Dunkelblau dargestellt. (Zur Zusammensetzung dieser Proben und Kontrollen, siehe Abb. 7).

Das Koordinatensystem ist in vier Quadranten eingeteilt (graue römische Zahlen). Datenpunkte in den Quadranten I und III repräsentieren veränderte Proteinmengen, die aus veränderten Wachstums- oder Messbedingungen resultieren. Datenpunkte in Quadrant II repräsentieren eine Erhöhung der Abundanz im Vergleich zur Kontrolle, die von der Arsenatbehandlung ausgelöst wurde. Die Daten, die in Quadrant IV zu sehen sind, zeigen eine arsenabhängige Verringerung in der Abundanz.

5.4.3.3 Gegenüberstellung der reziproken Messungen von Proteinen aus Reiswurzeln nach Kurzzeitbehandlung mit Arsenat

Für die Kurzzeitbehandlung wurden Pflanzen zunächst 8 Wochen lang aufgezogen und 16 h vor der Ernte mit 25 μM Arsenat behandelt. Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, unterschieden sich bei dieser kurzen Behandlung die reziproken Proben nicht von den Kontrollen. Da in den nur indirekt dem Arsen ausgesetzten Sprossen sogar noch geringere

Auswirkungen zu erwarten gewesen wären, wurde von einer Messung der Sprosse abgesehen.

Die wenigen Punkte, die sich in Abbildung 25 von den Kontrollen unterscheiden, wurden den Bedingungen für ein „signifikant in der Abundanz verändertes Protein“ nicht gerecht. Daher wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

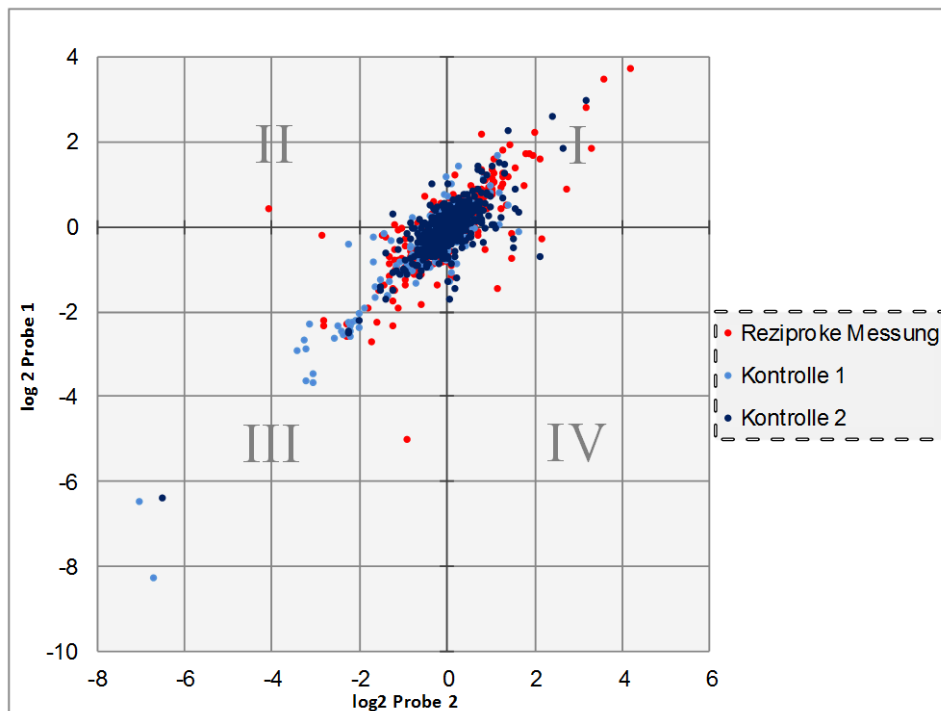


Abbildung 25: Reziproke Messungen von Wurzeln 56 Tage alter Reispflanzen, die entweder für 16 Stunden 25 μM Arsenat ausgesetzt waren oder unbehandelt blieben

Auf der x-Achse sind die \log_2 -Werte der Probe 2, auf der y-Achse die Werte der Probe 1 aufgetragen (in Rot dargestellt). Kontrolle 1 ist hier in Hellblau dargestellt. Kontrolle 2 ist in Dunkelblau dargestellt. (Zur Zusammensetzung dieser Proben und Kontrollen, vgl. Abb. 7)

Das Koordinatensystem ist in vier Quadranten eingeteilt (graue römische Zahlen). Datenpunkte in den Quadranten I und III repräsentieren veränderte Proteinmengen, die aus veränderten Wachstums- oder Messbedingungen resultieren. Datenpunkte in Quadrant II repräsentieren eine Erhöhung der Abundanz im Vergleich zur Kontrolle, die von der Arsenatbehandlung ausgelöst wurde. Die Daten, die in Quadrant IV zu sehen sind, zeigen eine arsenabhängige Verringerung in der Abundanz.

5.4.4 Langzeitbehandlung mit Arsenat induziert quantitative Veränderungen der Proteinzusammensetzung in der Reiswurzel

Nach der Analyse und statistischen Auswertung der Daten wurden alle Proteine, die einen p-Wert von weniger als 0,01 aufweisen, weiter untersucht. In den Proben, die aus den Wurzeln langzeitbehandelter Pflanzen gewonnen wurden, wurden 232 Proteine als in ihrer Abundanz im Vergleich zur unbehandelten Referenz verändert identifiziert. Diese 232

Proteine wurden mittels MapMan, RiceCyc und der bei Uniprot verfügbaren Angaben in verschiedene Stoffwechselwege eingeordnet. Auf diese Weise sollten ihre Funktion und daraus folgend ihr Einfluss auf den Stoffwechsel bestimmt werden. Nur 17 dieser 232 Proteine sind weniger als um das 1,5-fache verändert. Trägt man die \log_2 -Werte der reziproken Messungen (dieser 17 Proteine) gegeneinander auf, liegen die daraus resultierenden Datenpunkte alle annähernd auf der 45° Achse, was für eine gute Qualität dieser Daten spricht. Trotz der eher geringen Änderung wurden diese 17 Proteine daher weiter betrachtet, da z.B. regulatorische Proteine nicht unbedingt großen Schwankungen unterliegen müssen, um Wirkung zu zeigen.

Wie in Material und Methoden beschrieben, gab es Proteine, die zwar signifikant verschieden von der Kontrolle sind, aber zunächst nicht betrachtet wurden, weil eine der beiden Messungen einen \log_2 -Wert zwischen 0,4 und -0,4 zeigt. Diese Daten (von 102 Proteinen) sind nur in Tabellen und Abbildungen verwendet, wenn das explizit angegeben ist. Der Grund, diese Proteine bisweilen doch mit aufzuführen, ist, dass sie zum Teil die funktionelle Kategorisierung der anderen 232 Proteine unterstützen oder präzisieren.

Eine erste funktionelle Kategorisierung dieser 232 Proteine ist in Abbildung 26 und 27 gezeigt. Sie kann als Anhaltspunkt dafür betrachtet werden, welche Prozesse beeinflusst wurden. Allerdings übernehmen einige Enzyme mehrere Aufgaben, so dass nicht immer unmittelbar erkennbar ist, aufgrund welcher ihrer Funktionen sie akkumuliert wurden. Folglich muss eine solche Einordnung immer auch noch im Detail betrachtet werden.

5.4.4.1 Einordnung jener Proteine in Stoffwechselwege, bei denen die Proteinmengen im Vergleich zur Referenz geringer sind

Bei 116 der Proteine, die aus Wurzeln langzeitbehandelter Reispflanzen isoliert wurden (49 d, 25 μ M Arsenat), wurde im Vergleich zur Referenz eine geringere Proteinmenge bestimmt. Diese Proteine wurden mithilfe verschiedener Datenbanken Stoffwechselwegen zugeordnet (Abb. 26).

Zunächst fällt ins Auge, dass Proteine der Proteinbiosynthese im Allgemeinen durch Arsenat in ihrer Menge reduziert waren. Besonders die Akkumulation ribosomaler Proteine scheint in Gegenwart von Arsenat in den Wurzeln gehemmt zu werden. Enzyme, die in die Proteolyse involviert sind, zeigten sich in ihrer Menge in beide Richtungen verändert und sind eventuell sehr spezifisch für den Abbau bestimmter Proteine. Sehr ungewöhnlich ist die geringere Akkumulation von Proteinen, die in die Lichtreaktion und den Calvin-Zyklus der Photosynthese eingebunden sind. Proteine, die die Transkription der RNA beeinflussen, waren im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls in ihrer Menge reduziert. Auch Proteine, die eventuell in Prozesse wie die DNA-Synthese involviert sind, wurden geringer exprimiert. Proteine der DNA-Synthese sind in diesem Fall vorwiegend Histone.

Veränderungen in der Abundanz von Proteinen aus der Gluconeogenese und Glykolyse zusammen mit vermindertem Transport und der erhöhten Synthese von Enzymen der Elektronentransportkette in den Mitochondrien ließen sich in den Energiehaushalt einordnen. In die gleiche Richtung deutete auch eine erhöhte Expression von Enzymen des Citratzyklus‘.

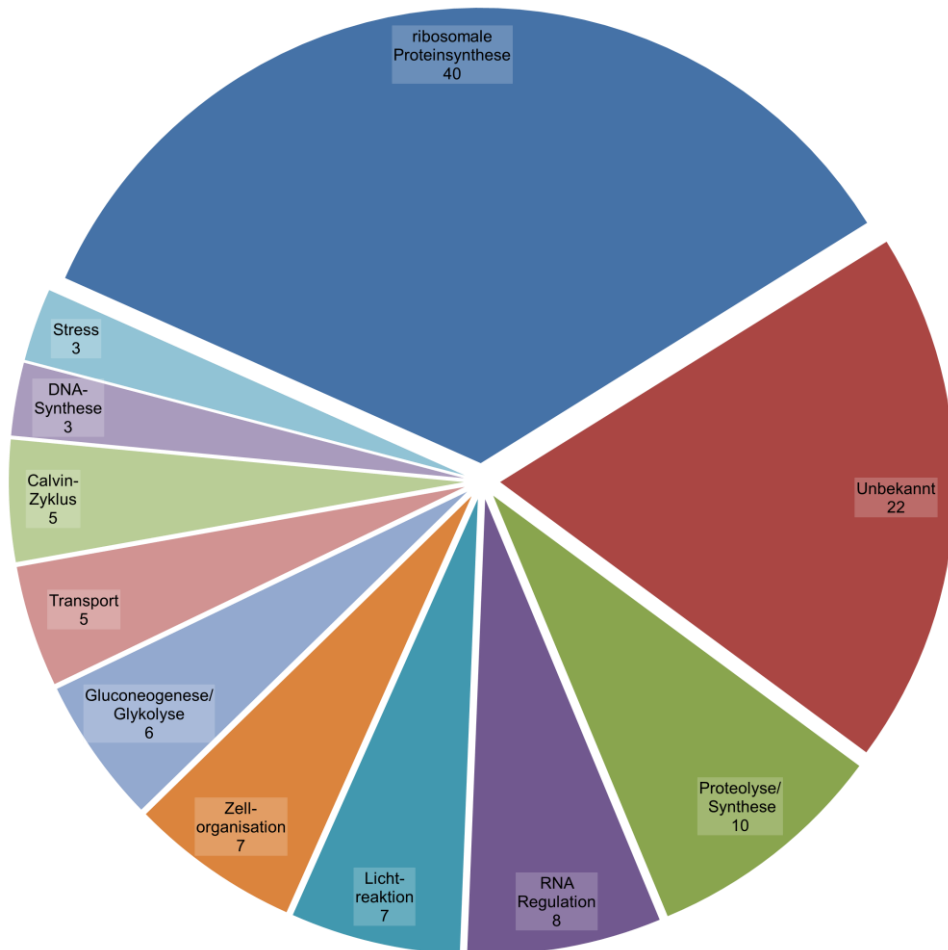


Abbildung 26: Einordnung jener Proteine in Stoffwechselwege, bei denen die Proteinmengen im Vergleich zur Referenz niedriger sind

Funktionelle Kategorisierung der Proteine, die in ihrer Menge nach Langzeitbehandlung (49 Tage) mit 25 µM Arsenat in der Wurzel herunterreguliert waren.

Im Anhang (Tabelle 2) befindet sich die Liste der Proteine mit genauerer Beschreibung, Daten zur Quantifizierung und deren farblichen Zuordnung zu diesem Diagramm.

5.4.4.2 Einordnung jener Proteine in Stoffwechselwege, bei denen die Proteinmengen im Vergleich zur Referenz höher sind

116 Proteine zeigten unter diesen Bedingungen (49 d, 25 µM Arsenat) eine im Vergleich zur Referenz erhöhte Proteinabundanz. Auch diese Proteine wurden mit Hilfe von 70

verschiedenen Datenbanken Stoffwechselwegen zugeordnet (Abb. 27). Dabei fällt auf, dass eine Vielzahl dieser Proteine Prozessen zugeordnet werden konnte, bei denen schon gezeigt wurde, dass die Transkriptmengen von Proteinen in diesen Stoffwechselwegen unter Arsenstress Veränderungen aufweisen. Dazu gehören die Glutathion-S-Transferasen, Proteine im Redox-Metabolismus und Proteine, die im Aminosäurestoffwechsel relevant sind. Wenn auch nur in einzelnen Veröffentlichungen, so wird auch von veränderten Transkriptmengen bei Proteinen aus dem Hormon- und Sekundärstoffwechsel berichtet. Änderungen von Proteinmengen bei Enzymen aus dem Kohlenstoffmetabolismus zusammen mit Variationen in der Abundanz von Proteinen, die im Elektronentransport eingeordnet werden konnten, dem allgemeinen Transport von Metaboliten und Ionen sowie dem Fettstoffwechsel eröffnen allerdings eine neue, weniger bekannte Ebene der Arsenat-Auswirkungen auf den Stoffwechsel von Pflanzen.

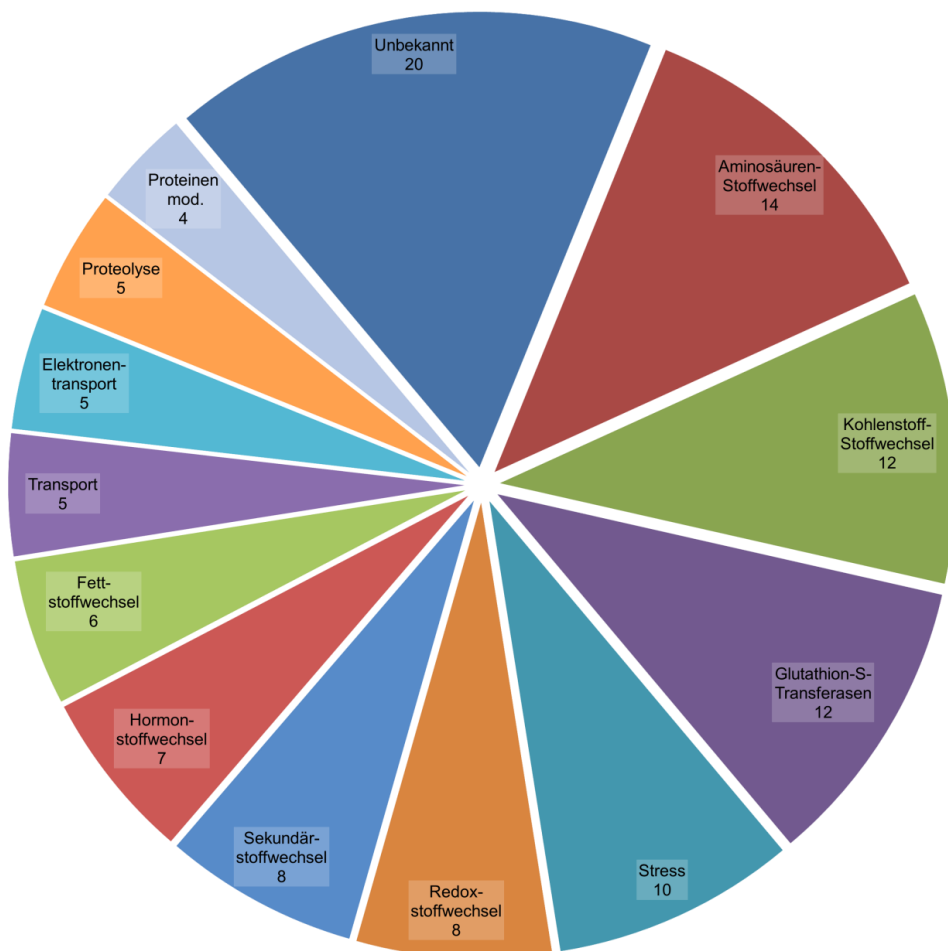


Abbildung 27: Einordnung derjenigen Proteine in Stoffwechselwege, bei denen die Proteinmengen im Vergleich zur Referenz höher sind

Funktionelle Kategorisierung der Proteine, die in ihrer Menge nach Langzeitbehandlung (49 Tage) mit 25 µM Arsenat in der Wurzel hochreguliert waren.

Im Anhang (Tabelle 2) befindet sich die Liste der Proteine mit genauerer Beschreibung, Daten zur Quantifizierung und deren farblichen Zuordnung zu diesem Diagramm.

Die in ihrer Proteinmenge von der Kontrolle abweichenden Proteine, die mit dem Stoffwechsel von Glutathion oder allgemein mit dem Redoxstoffwechsel assoziiert sind, sind in Abbildung 28 dargestellt. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, waren Enzyme von wichtigen ROS-Entgiftungsmechanismen stärker exprimiert als in der Kontrolle. Bei der Reduktion von H_2O_2 durch die Ascorbat-Peroxidase sowie der Reaktion der Glutathion-S-Transferasen (mit Glutathionperoxidaseaktivität) wird direkt oder indirekt Glutathion als Elektronendonator verwendet. Die – durch die erhöhte Abundanz implizierte – erhöhte Aktivität dieser beiden Enzyme wäre durch die Glutathionsynthese indirekt mit der Aminosäuresynthese, dem Schwefelstoffwechsel und dem Energiestoffwechsel verbunden (Abb. 28).

Weniger bekannt sind die Veränderungen der Proteinmengen von Proteinen der Atmungskette und den damit verknüpften Stoffwechselwegen, die in Abbildung 29 dargestellt sind. Eine detailliertere Erklärung zu den Abbildungen (28 und 29) findet sich in der Einleitung (Abbildungen 3 und 4). In den Tabellen im Anschluss an die Abbildungen 28 und 31 sind die Proteine und Enzyme aufgelistet, die in ihrer Proteinmenge durch die 49 Tage lange Arsenintoxikation der Pflanzen in den Wurzeln verändert worden sind. In der Liste enthalten sind jeweils die spezifische Kennung des Proteins bei Uniprot (Uniprot-ID), die Lokalisierungskennung (Locus ID, MSU), der Stoffwechselweg, in dem das Protein zu finden ist, und der Faktor, um welchen die Abundanz des Proteins im Vergleich zur Kontrolle verändert war (*fold change*). Ein negatives Vorzeichen zeigt hierbei an, dass das Protein bei Arsenstress geringer exprimiert waren als in der unbehandelten Referenz.

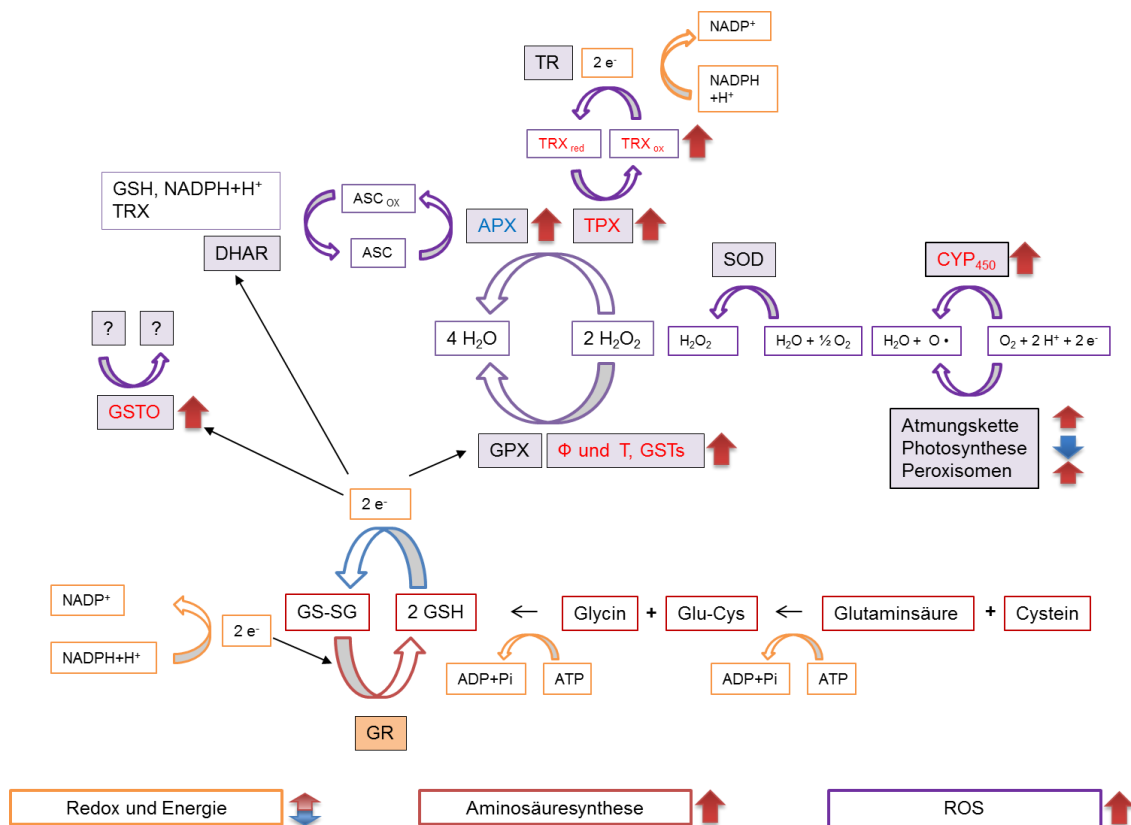


Abbildung 28: Veränderte Proteinabundanz bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies

Dargestellt sind die Abundanzänderungen von Proteinen, die aus Reiswurzeln von 49 Tage mit $25 \mu\text{M}$ Arsenat behandelten Pflanzen stammen, im Vergleich zur unbehandelten Referenz.

Die Pfeile zeigen an, in welche Richtung die Proteine reguliert sind. Farbige Proteinnamen zeigen die Regulation der gleichen Proteine im Transkriptom an. Für die Entstehung von ROS sind die Atmungskette, die Photosynthese, Cytochrom P₄₅₀-Proteine (CYP₄₅₀) und die Peroxisomen bekannt. Die Sauerstoffradikale werden mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt. Um H_2O_2 zu entgiften, gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Ascorbat-Peroxidase (APX), welche Ascorbat (ASC) als Elektronendonator verwendet, die Glutathionperoxidase (GPX) bzw. Glutathion-S-Transferasen (GSTs), die Glutathionperoxidaseaktivität aufweisen, oder die Thioredoxin-Peroxidasen (TPX). All diese Enzyme verwenden Elektronendonatoren und H^+ -Ionen, um H_2O_2 in Wasser umzusetzen.

Dabei dienen Thioredoxin (TRX), Glutathion (GSH) und Ascorbat (ASC) als Elektronendonatoren. Die Glutathion-Reduktase (GR), die Dehydroxyascorbat-Reduktase (DHAR) und die Thioredoxin-Reduktase (TR) sind dann dafür verantwortlich, die oxidierten Elektronendonatoren wieder zu reduzieren.

Tabelle mit Informationen zu den in Abbildung 28 dargestellten Enzymen

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
Redox ascorbate	LOC_Os07g49400.1	2.01	Q0D3B8
Redox thioredoxin	LOC_Os07g08840.1	8.53	TRXH1
Redox peroxiredoxin	LOC_Os07g44440.1	9.64	REHYB
Glutathione S transferases	LOC_Os01g55830.1	3.66	Q0JJ25
Glutathione S transferases	LOC_Os02g21460.1	6.13	Q6EQX0
Glutathione S transferases	LOC_Os10g38360.1	7.59	Q945W6
Glutathione S transferases	LOC_Os10g38780.1	7.74	Q8L4V6
Glutathione S transferases	LOC_Os10g38189.1	10.15	Q6QN18
Glutathione S transferases	LOC_Os10g38340.1	13.13	Q8RUJ2
Glutathione S transferases	LOC_Os03g50130.1	14.93	Q10E40
Glutathione S transferases	LOC_Os01g27210.1	15.28	Q5ZC86
Glutathione S transferases	LOC_Os10g38489.1	14.75	Q9FUE3
Glutathione S transferases	LOC_Os10g38740.1	28.98	GSTU6
Glutathione S transferases	LOC_Os03g17480.1	15.71	IN21A
Cytochrome P450	LOC_Os03g55240.1	3.79	Q0DND2
Cytochrome P450	LOC_Os07g44140.1	4.83	Q8LIR5
Lipid metabolism	LOC_Os02g17390.1	1.76	MFP
Amino acid metabolism/ lipid metabolism	LOC_Os02g57260.1	2.06	Q84P96
Amino acid metabolism	LOC_Os07g09060.1	3.10	Q6Z4E4
Amino acid metabolism	LOC_Os07g08430.1	5.89	Q6ZL61
Amino acid metabolism	LOC_Os06g49505.1	1.77	Q5Z9H5
Amino acid metabolism	LOC_Os07g42600.1	1.90	Q0D4M5
Amino acid metabolism	LOC_Os05g38150.1	-1.51	Q0DHN6
Amino acid metabolism	LOC_Os03g53650.1	4.32	CYSK2
Amino acid metabolism	LOC_Os12g42980.1	5.17	CYSK1
Amino acid metabolism	LOC_Os04g55720.1	2.59	Q7XMP6
Amino acid metabolism	LOC_Os03g06200.1	5.24	Q8LMR0
Amino acid metabolism	LOC_Os03g42110.1	1.55	ARGC
Glutathione S transferases	LOC_Os01g72150.1	2.57	B7FAD4
Biodegradation of Xenobiotics/ lipid metabolism	LOC_Os01g58380.1	1.28	Q8S1G9

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien. Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

In Abbildung 29 sind die Atmungskette und ihre multiplen Wege der Zufuhr an Elektronen dargestellt. Diese werden bei verschiedenen Schritten des Citratzyklus' oder der Glykolyse oder von anderen Reaktionen in die Atmungskette eingespeist. Die Elektronen werden verwendet, um einen Protonengradienten über die Membran aufzubauen. Die durch den Protonengradienten angetriebenen ATPasen synthetisieren ATP, den temporären Energiespeicher in lebenden Organismen. Wie in Abbildung 5 und der Einleitung schon beschrieben wurde, könnten einige dieser Reaktionen durch Arsenat beeinflusst werden. In der Tat zeigten alle diese Enzyme Änderungen in ihrer Abundanz. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die Succinat-Dehydrogenase waren dabei herunterreguliert, während die Pyruvat-Dehydrogenase und die Hexokinase hochreguliert waren.

Die ATPasen zeigten kein homogenes Bild. Neben einer in der Lokalisation variablen ATPase (LOC_Os06g39740.1), die in der Proteinmenge verringert ist, finden sich bei genauerer Betrachtung der Daten noch weitere ATPasen. Einige Untereinheiten von ATPasen, bei denen einer der \log_2 -Werte innerhalb der Grenzen von 0,4 bis -0,4 liegt, sind in ihrer Abundanz leicht erhöht. All diese ATPasen sind in den Mitochondrien lokalisiert.

Auch ein Phosphattransporter (LOC_Os09g28160.1) war unter den Stressbedingungen in größeren Mengen vorhanden als in den Kontrollen. Neben der erhöhten Abundanz von spannungsabhängigen Anionenkanälen, die multiple Moleküle in den Intermembranraum transportieren können, war auch die Proteinmenge von Proteinen der Atmungskette selbst höher (siehe folgende Tabelle).

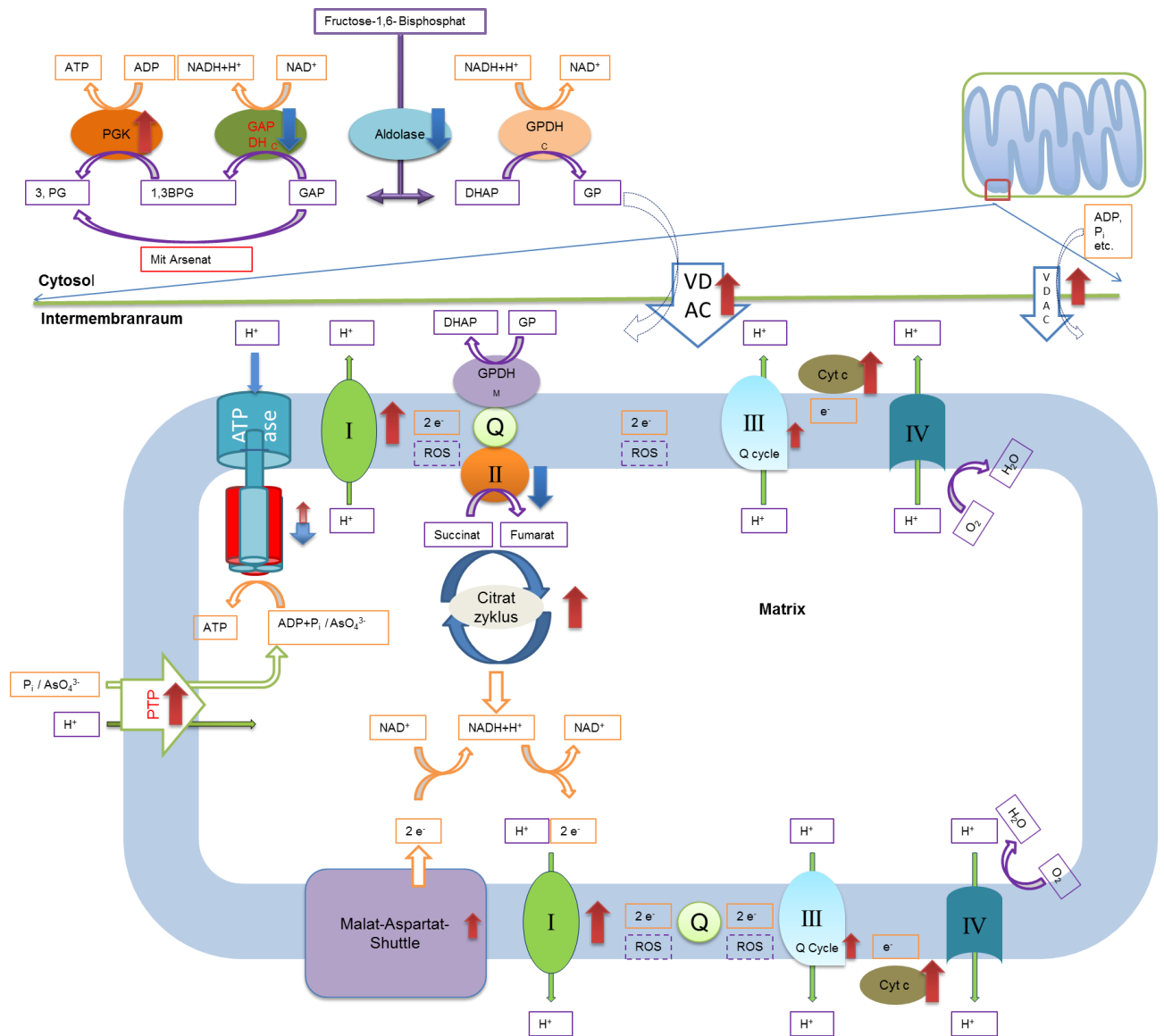


Abbildung 29: Die Atmungskette mit ihren molekularen Komponenten und ihren direkten Verknüpfungen mit dem Citratzyklus und der Glykolyse.

Die Abundanzänderung von Proteinen, die aus Reisswurzeln von 49 Tage lang mit 25 μM Arsenat behandelten Pflanzen stammen, im Vergleich zur unbehandelten Referenz. Die etwas breiteren Pfeile zeigen an, dass diese Proteine allen Kriterien entsprechen, während die dünneren Pfeile Proteine anzeigen, bei denen eine der beiden Messungen einen Wert zwischen 0,4 und -0,4 aufweist. Alle Proteine sind signifikant verschieden von der Kontrolle. Rote Pfeile zeigen an, dass ein Protein hochreguliert ist, blaue Pfeile, dass das Protein im Bezug zur Referenz herunterreguliert ist. Abkürzungen: Cytochrom c (Cyt c), mitochondriale Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH_M), cytosolische Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH_C), Glycerin-3-Phosphat (GP), Dihydroxyacetophosphat (DHAP), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH), 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3BPG), 3-Phosphoglycerat (3PG) Phosphoglyceratkinase (PGK), D-3-Phosphoglycerat (3GP), mitochondriale Phosphattransporter (PTP), spannungsabhängiger Anionenkanal (VDAC).

Tabelle mit Informationen zu den in Abbildung 29 dargestellten Enzymen

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
TCA Citrate synthase	LOC_Os02g10070.1	1.51	Q7F8R1
TCA pyruvate DH.E1	LOC_Os09g33500.1	1.89	Q0J0H4
TCA succinate dehydrogenase	LOC_Os07g04240.1	-1.40	DHSA
Cytochrome c	LOC_Os05g23620.1	1.39	Q0DJC3
F1-ATPase	LOC_Os06g39740.1	-3.43	ATPB
NADH-DH complex I	LOC_Os07g15880.1	2.49	Q7EYR6
NADH-DH complex I	LOC_Os03g62490.1	5.06	Q6AVQ4
NADH-DH LOCALISATION not clear	LOC_Os12g33958.1	1.70	Q8HCQ3
unknown /complex I	LOC_Os08g33460.1	1.59	Q0J5I8
unknown /complex II	LOC_Os08g02080.1	-2.94	Q6ZCC4
unknown /complex II	LOC_Os04g34100.1	-2.31	Q0JDA2
Phosphate transport	LOC_Os09g28160.1	11.98	Q0J198
Transport	LOC_Os03g10510.1	1.83	VDAC5
Transport	LOC_Os05g45950.1	3.12	VDAC2
Fructokinase	LOC_Os01g66940.1	2.23	SCRK1
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	LOC_Os04g40874.1	-1.67	Q7X7I6
Hexokinase	LOC_Os01g53930.1	1.35	Q0JJF0
Hexokinase	LOC_Os05g44760.1	1.91	Q0DGM7
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)	LOC_Os08g03290	-1.71	G3PC
Phosphofructokinase (PFK)	LOC_Os05g44922.1	-1.73	Q65X97
TCA / pyruvate DH.E2	LOC_Os02g01500.1	1.46	Q6YPG2
TCA / succinyl-CoA ligase	LOC_Os02g40830.1	1.82	Q0DZG1
TCA /pyruvate DH.E3	LOC_Os01g22520.1	1.51	Q9ASP4
TCA atp-citrate lyase	LOC_Os12g37870.1	1.47	ACLA3
TCA isocitrate dehydrogenase	LOC_Os04g40310.1	1.25	Q0JCD0
TCA/ malate DH	LOC_Os05g49880.1	1.38	Q6F361
ATPase	LOC_Os12g14930.1	1.65	Q8HCR5
cytochrome c reductase	LOC_Os04g32660.1	1.33	Q7XLG4
F1-ATPase	LOC_Os06g43850.1	1.27	Q0DAL0
F1-ATPase	LOC_Os05g47980.1	1.36	ATPB
F1-ATPase	LOC_Os09g08910.1	1.36	ATPAM
NADH-DH LOCALISATION not clear	LOC_Os03g56300.1	1.35	Q8HCR7
Glutathione S transferases	LOC_Os01g72150.1	2.57	B7FAD4

Fermentation/ pyruvate decarboxylase	LOC_Os03g18220.1	-1.36	PDC2
Glucose-6-phosphate isomerase	LOC_Os03g56460.1	1.64	G6PIA
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)	LOC_Os02g38920.1	-1.63	G3PC3

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien.

Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

Weitere wichtige Schnittstellen sind in diesem Schema der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Dazu zählt die Pyruvat-Dehydrogenase, sie war in ihrer Abundanz gegenüber den Kontrollbedingungen erhöht. Die Pyruvat-Dehydrogenase, die in der Liste beim Citratzyklus aufgeführt ist, stellt eine Verknüpfung von Glykolyse und Citratzyklus dar. Die ebenfalls in der Einleitung erwähnte Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde dagegen weniger exprimiert. Auch die β -Oxidation ist durch ihr Endprodukt, das Acetyl-CoA, indirekt mit der Atmungskette verknüpft und kann auf diese Weise zum Aufbau von ATP verwendet werden. Im Gegensatz zur Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Succinat-Dehydrogenase waren die Enzyme der β -Oxidation sowie ein Acetyl-CoA-Transporter in größeren Mengen vorhanden als in unbehandelten Pflanzen.

Veränderungen der Abundanz bei Enzymen und Proteinen, die Aufgaben im epigenetischen Bereich haben, dem Lipid- oder Sekundärstoffwechsel zugerechnet werden oder aber im Hormonhaushalt eine Rolle spielen, waren zwar auch vorhanden, ließen sich aber aufgrund der geringen Anzahl nicht schematisch darstellen. Proteine, die hier dem epigenetischen Bereich zugeordnet wurden, waren alle in der Proteinmenge herunterreguliert. Betrachtet man die Proteine, die dem Lipidstoffwechsel zugeordnet wurden, so waren diese alle in ihrer Abundanz erhöht und konnten zum größten Teil der β -Oxidation zugeordnet werden. In den vorliegenden Proteomdaten waren die Proteine, die mit dem Sekundärstoffwechsel verknüpft werden können, fast alle im Vergleich zur Referenz in ihrer Proteinmenge erhöht. Außerdem konnten die meisten dieser Proteine in den Zusammenhang mit Phenylpropanoiden und deren Synthese gestellt werden. Phenylpropanoide sind wichtige Zwischenprodukte in der Biosynthese von Lignin, Suberin, Flavonoiden und Cumarinen.

Epigenetik, Lipidstoffwechsel und Sekundärstoffwechsel

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
Epigenetik			
Argonaute	LOC_Os01g16870.1	-1.99	AGO4A
Argonaute	LOC_Os04g06770.1	-1.61	AGO4B
FVE/MSI4	LOC_Os01g51300.1	-1.99	Q5NAI9
Histone	LOC_Os03g58470.1	-1.81	Q851P9
Histone	LOC_Os05g38640.1	-1.41	H2A4
Histone deacetylase	LOC_Os05g51830.1	-1.51	Q0DFD6
Lipidstoffwechsel			
Lipid metabolism	LOC_Os03g19250.1	1.7	Q10MK9
Lipid metabolism	LOC_Os02g32490.1	5.27	Q6H798
Lipid metabolism	LOC_Os02g17390.1	1.76	MFP
Putative carnitine/acylcarnitine translocas		4.78	A3C7K0
Pyruvate dikinase	LOC_Os05g33570.1	1.97	PPDK1
Hormone			
S-Adenosylmethioninesynthetase	LOC_Os05g04510.1	1.89	METK1
S-Adenosylmethioninesynthetase	LOC_Os01g22010.1	2.81	METK2
Sekundärstoffwechsel			
Brassinosteroid.signal transduction	LOC_Os08g21660.1	-1.45	Q6YS69
BRI1 protein brassinosteroid insensitive 1	LOC_Os01g70020.1	-1.41	Q5JKH1
Jasmonate.synthesis-degradation	LOC_Os06g11290.1	4.4	OPR1
Jasmonate.synthesis-degradation	LOC_Os06g11210.1	20.28	OPR5
Jasmonate synthesis-degradation lipoxygenase	LOC_Os03g49380.1	2.66	Q0DPC9
Cytokinins-O-glucoside biosynthesis	LOC_Os01g53350.1	9.9	Q942C4
Cytokinins-O-glucoside biosynthesis	LOC_Os03g55050.1	9.13	Q9AUV4
Caffeate O-methyltransferase	LOC_Os08g06100.1	1.81	OMT1
Isoprenoids	LOC_Os09g07830.1	1.72	Q0J366
Lignin biosynthesis (CAD)	LOC_Os01g34480.1	4.18	Q5QM39
Lignin biosynthesis (CAD)	LOC_Os09g23530.1	1.94	CAD8A
Lignin biosynthesis (PAL)	LOC_Os02g41630.2	-2.34	Q0DZE3

Phenazine biosynthesis	LOC_Os01g16146.1	3.95	Q9SDD7
Phenylpropanoids	LOC_Os11g31090.1	3.19	Q0ISK0
Phenylpropanoids	LOC_Os07g04970.1	5.25	Q8H4K0
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	LOC_Os01g71830.1	1.97	Q5JMU8
Simple phenols	LOC_Os12g15680.1	20.63	LAC24
Epigenetic / Transkriptionsfaktoren			
DNA synthesis hat-like transposase	LOC_Os03g52310.1	-1.41	Q6AVI0
Histone	LOC_Os01g64640.1	-1.25	B7F6J5
RNA regulation of transcription Alfin-like	LOC_Os07g41740.1	-1.42	ALFL9
RNA regulation of transcription putative transcription regulator	LOC_Os03g22730.1	-1.46	Q0DRW2
RNA regulation of transcription putative transcription regulator	LOC_Os03g22880.1	-1.30	Q10LF8
RNA regulation of transcription Zn-finger	LOC_Os02g32350.1	-1.44	Q6H547
Lipidstoffwechsel			
Lipid metabolism Acetyl CoA Carboxylation	LOC_Os05g22940.1	1.39	ACC2
Lipid metabolism phospholipase D	LOC_Os01g07760.1	-1.58	Q0JQB1
Lipid metabolism pyruvate kinase	LOC_Os04g58110.1	-1.31	Q7XKB5
Lipid metabolism pyruvate kinase	LOC_Os11g05110.1	-1.22	Q2RAK2
Sekundärstoffwechsel			
Phenylpropanoids	LOC_Os01g09010.1	1.78	Q9LGQ6

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien. Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

Wie schon Abbildung 26 zu entnehmen war, waren auch einige ribosomale Proteine in ihrer Abundanz verändert. Ribosomale Proteine sind für die Proteinsynthese essenziell. Interessanterweise waren all diese Proteine im Vergleich zur Referenz in ihrer Menge reduziert.

Ribosomale Proteine

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S10	LOC_Os02g34460.2	-1.56	Q6Z105
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S14	LOC_Os02g06700.1	-1.92	Q6H7T1
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S15	LOC_Os07g08660.1	-1.73	Q0D852
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S16	LOC_Os11g03400.1	-1.78	RS16
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S17	LOC_Os10g27190.1	-1.86	Q7XEQ3
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S18	LOC_Os03g58050.1	-1.61	Q8H588
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S2	LOC_Os03g59310.1	-1.49	Q84M35
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S27	LOC_Os02g27769.1	-1.77	Q6K5R5

ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S28	LOC_Os10g27174.1	-1.75	Q0IXR7
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S3	LOC_Os03g38000.1	-1.56	Q75G91
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S3A	LOC_Os12g21798.1	-1.65	Q0INR5
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S6	LOC_Os07g42950.1	-1.57	Q8LH97
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S7	LOC_Os03g18570.1	-1.66	Q10MS5
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S8	LOC_Os04g28180.1	-1.68	Q0JDZ7
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S9	LOC_Os03g05980.1	-1.54	Q2R1J8
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.SA	LOC_Os07g42450.1	-1.82	Q8H3I3
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L12	LOC_Os04g50990.1	-1.68	Q0JAI2
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L13	LOC_Os03g37970.1	-1.67	Q7XJB4
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L14	LOC_Os02g40880.1	-1.70	Q6K1Q6
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L15	LOC_Os03g40180.1	-1.68	Q8H8S1
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L17	LOC_Os09g08430.1	-1.46	Q6K1W6
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L18	LOC_Os05g06310.1	-1.51	Q5WMY3
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L18	LOC_Os03g22180.1	-1.57	Q10LN7
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L18A	LOC_Os01g47660.1	-1.53	Q0JKK9
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L19	LOC_Os03g21940.1	-1.59	Q10LR6
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L21	LOC_Os03g04750.1	-1.69	Q10RZ3
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L22	LOC_Os07g47710.1	-1.56	Q6YSX0
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L22	LOC_Os03g22340.1	-1.56	Q762A6
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L27	LOC_Os10g41470.1	-1.66	Q7XC31
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L3	LOC_Os11g06750.1	-1.56	Q53JG0
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L35A	LOC_Os05g48310.1	-1.37	Q61608
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L4/L1	LOC_Os07g08330.1	-1.68	Q0D868
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L6	LOC_Os04g39700.1	-2.41	Q7XR19
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L6	LOC_Os02g37862.1	-1.73	Q6YY64
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L7	LOC_Os04g51630.1	-1.69	Q0JAC6
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L7A	LOC_Os09g32976.1	-1.44	Q0J0I3
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L8	LOC_Os12g38000.1	-1.45	Q2QNF3
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.P0	LOC_Os08g03640.1	-1.64	Q0J878
ribosomal protein.prokaryotic.unknown organellar.50S subunit.L10A	LOC_Os02g21660.1	-1.83	Q6ER67
ribosomal RNA	LOC_Os08g09350.1	-1.86	NUCL1
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S13	LOC_Os08g02410.1	-1.23	RS132_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S15A	LOC_Os02g27760.1	-1.50	Q6K5R6_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S24	LOC_Os06g36160.1	-1.42	Q5Z9S4_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S25	LOC_Os08g44480.1	-1.48	Q6YZI2_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S4	LOC_Os02g01560.1	-1.54	Q0E4Q0_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L11	LOC_Os06g35730.1	-1.46	B7EI57_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L13A	LOC_Os03g54890.1	-1.36	Q75J18_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L23A	LOC_Os04g42270.1	-1.44	Q0JBZ7_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L26	LOC_Os12g05430.1	-1.36	Q2QXN5_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L34	LOC_Os08g33920.1	-1.36	Q6Z537_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L35	LOC_Os02g30050.1	-1.40	Q6K667_ORYSJ

ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L35A	LOC_Os02g54470.1	-1.29	Q6K8U8_ORYSJ
ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L9	LOC_Os02g01332.1	-1.49	Q0E4R7_ORYSJ

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien. Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

5.4.5 Langzeitbehandlung von Reispflanzen mit Arsenat und die induzierten quantitativen Veränderungen der Proteinzusammensetzung in den Sprossen

Die Analysen der durch Arsenat induzierten quantitativen Veränderungen der Proteinzusammensetzung von langzeitbehandelten Reispflanzen ergaben 21 in der Abundanz veränderte Proteine in den Sprossen, von denen wiederum 17 um mehr als das 1,5-fache verändert waren. Dabei zeigt sich, dass die meisten der Proteine im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert waren.

Nur zwei dieser 21 Proteine waren in ihrer Proteinmenge erhöht, diese (nahezu identischen Proteine) gehören zu den Rezeptor-Signal-Kinasen.

Hochregulierte Proteine im Spross

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
Signalling receptor kinases	LOC_Os03g16950.1	1.75	Q10N98
Signalling receptor kinases	LOC_Os03g16960.1	1.76	Q10N97

Alle weiteren Proteine, die in den Sprossen durch Arsen in ihrer Abundanz verändert wurden, waren im Vergleich zur Referenz geringer vorhanden. Auffallend war die verringerte Menge bei Proteinen, die in den Redoxstoffwechsel involviert sind. Dies steht im Gegensatz zu den Proben, die aus den Wurzeln gewonnenen wurden. Betroffen waren z.B. Proteine wie Glutathion-S-Transferasen, eine Katalase und zwei Peroxidasen.

Proteine des Redoxstoffwechsels

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
Glutathione S transferases	LOC_Os10g39740.1	-1.35	Q7XCK0
Peroxidasen	LOC_Os04g59150.1	-2.9	Q7XSV2
Peroxidasen	LOC_Os02g14440.1	-2.9	Q6ER49
Redox.dismutases and catalases	LOC_Os02g02400.1	-2.3	CATA1
Glutathione S transferases	LOC_Os03g04240.1	-1.43	Q8H8D8

Glutathione S transferases	LOC_Os03g04220.1	-1.33	Q8H8D6
Glutathione S transferases	LOC_Os01g55830.1	1.38	Q0JJ25
Peroxidases	LOC_Os01g73170.1	-1.55	Q5JMS4

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien. Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

Die nächste Gruppe an Proteinen mit geringerer Quantität waren Proteine, die in den Photosynthesestoffwechsel involviert sind. Übereinstimmend mit Studien des Transkriptoms waren diese Proteine auch bei diesen Proteommessungen in der Abundanz vermindert.

Proteine der Photosynthese

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os10g21406.1	-1.78	PSAC
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os10g21310.1	-1.49	PSBB
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os02g24634.1	-1.77	PSBD
PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os11g07020.1	-1.62	ALFC
PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os08g02700.1	-1.44	Q6YPF1
PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os08g44680.1	-1.53	Q84PB4
PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os03g56670.1	-1.34	Q8S7H8
PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LOC_Os03g39610.1	-1.43	CB23
PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LOC_Os11g13890.1	-1.28	Q53N83
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os08g15322.1	-1.50	PSBE
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os10g21212.1	-1.40	PSBC
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os08g15296.1	-1.48	PSBH
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os08g10020.1	-1.30	Q6ZBV1

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien. Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

Weitere zwölf Proteine, die unter diesen Bedingungen teils sehr stark in ihrer Menge verändert wurden, ließen sich nicht gruppieren. So wurden hier Veränderungen bei der Abundanz von Proteinen gemessen, die bei der Jasmonsäuresynthese, im Zellzyklus, beim *Calcium Signaling*, bei der Stressantwort und der Proteindegradation beteiligt sind.

Auch hier ist auffällig, dass die Lipoxygenase, die in die Jasmonsäuresynthese involviert ist, im Gegensatz zu den Befunden aus den Wurzeln herunterreguliert war.

Weitere Proteine in den Sprossen

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	Uniprot ID
Acid and other phosphatases	LOC_Os01g09540.1	-9.06	Q9LG77
Cell cycle	LOC_Os02g02890.1	-1.38	Q6ZH98
Cell.organisation	LOC_Os05g31750.1	-1.55	Q6L4C6
Jasmonate synthesis-degradation lipoxygenase	LOC_Os12g37260.1	-7.12	Q2QNN5
N-metabolism.ammonia metabolism.glutamine synthase	LOC_Os04g56400.1	-1.39	Q0J9E0
not assigned.unknown	LOC_Os04g38390.1	-1.82	Q7XRE7
not assigned.unknown	LOC_Os05g32820.1	-3.28	Q75HW4
not assigned.unknown	LOC_Os05g22614.1	-1.51	Q0DJF9
not assigned.unknown	LOC_Os01g03310.1	-10.76	Q0JR29
Protein degradation ubiquitin.E3.RING	LOC_Os11g46000.1	-2.18	Q2QZH2
Rhodanese	LOC_Os02g49680.1	-1.69	Q6YWR8
Stress.abiotic	LOC_Os12g38170.1	-2.47	Q2QND6

Im Anhang findet sich eine Tabelle (Tabelle 2) mit allen Proteinen, die in ihrer Abundanz signifikant verändert waren. Zusätzlich enthält die Tabelle Informationen wie die verschiedenen Identifikationsnummern, Zuordnung zu den Kuchendiagrammen, die genauen \log_2 -Werte aller Messungen und Verweise auf andere Veröffentlichungen, in denen die Transkripte dieser Proteine oder diese Proteine selbst als verändert identifiziert wurden.

5.4.6 Vergleich der Proteomdaten mit anderen Studien

Es wurden mehrere Veröffentlichungen mit den von uns generierten Daten verglichen. Da die Parameter wie Arsenkonzentration, Expositionsdauer, Reissorte und verwendetes Medium nie exakt die gleichen waren, wurde der Vergleich auf die Frage beschränkt, ob die Regulationsrichtung übereinstimmt.

Als Transkriptomuntersuchungen von Reis unter Arsenstress wurden die Studien von Norton, G.J., et al., Chakrabarty, D., et al., Yu, L.J., et al., Huang, T.L., et al. herangezogen. Hinzu kamen die zwei Proteomik-Studien von Ahsan, N., et al., Liu, Y., et al. [11-16].

In der folgenden Tabelle sind alle Proteine aufgelistet, die in der vergleichenden Proteomstudie von Ahsan, N., et al. gefunden wurden und deren Proteinmenge auch in dieser Arbeit durch Arsenat in den Wurzeln in die gleiche Richtung verändert war.

Signalweg	MSU (LOC_Os ID)	Fold change	ID in der Veröffentlichung	Veröffentlichung	Uniprot ID
amino acid metabolism.synthesis	Loc_Os05g04510.1	1.89	CAC82203	N.ahsan et al	Q0DKY4
amino acid metabolism.synthesis	Loc_Os01g22010.1	2.81	CAC82203	N.ahsan et al	P93438
amino acid metabolism.synthesis	Loc_Os12g42980.1	5.17	Q9XEA6	N.ahsan et al	Q9XEA6
beta 1,3 glucan hydrolases.glucan endo-1,3-beta-glucosidase	Loc_Os01g71830.1	1.97	xp_463703	N.ahsan et al	Q5JMU8
glutathione S transferases	Loc_Os10g38740.1	28.98	NP_922482	N.ahsan et al	Q06398
glutathione S transferases	Loc_Os03g50130.1	14.93	AAQ02686	N.ahsan et al	Q10E40
glutathione S transferases	Loc_Os03g17480.1	15.86	XP_493844	N.ahsan et al	Q10N44
glycolysis.cytosolic branch.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)	Loc_Os08g03290.1	-1.71	XP_479895	N.ahsan et al	Q0J8A4
hormone metabolism.jasmonate	Loc_Os06g11290.1	4.40	Bad35829	N.ahsan et al	Q84QK0
hormone metabolism.jasmonate	Loc_Os06g11210.1	20.28	cad89604	N.ahsan et al	Q69T10
myrosinases-lectin-jacalin	Loc_Os01g24710.1	2.61	Np_908901	N.ahsan et al	Q0JMY8
not assigned.unknown	Loc_Os07g48490.1	-5.62	CAA64683	N.ahsan et al	Q6Z4N6
protein.synthesis.elongation	Loc_Os01g71230.1	-1.99	NP_914976	N.ahsan et al	Q8RUI4
glycolysis.cytosolic branch.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)	Loc_Os02g38920.1	-1.63	XP_479895	N.Ahsan et al.	Q6K5G8
redox.thioredoxin	Loc_Os05g06430.1	-1.26	AAX85991	N.Ahsan et al.	Q75M08

Gelb markierte Proteine entsprechen in einer der beiden Messungen nicht allen Kriterien.

Das bedeutet, dass der log2-Wert in einer der Messungen innerhalb der Grenzen zwischen 0,4 und -0,4 liegt.

In der Veröffentlichung von Ahsan, N., et al wurden außerdem noch weitere Proteine ausgeschnitten und identifiziert. Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Proteine wurden in dieser Arbeit nicht als sicher in ihrer Abundanz verändert identifiziert. Leider ist wie in diesem Fall der Vergleich durch die verschiedenen Identifikationsnummern keineswegs einfach und wird bei Proteinen mit unbekannter Funktion noch erschwert.

Signalweg	ID in der Veröffentlichung
Unknown protein	XP_479269
Glutamine synthetase root isozyme (GS)	NP_912586
OSJNBa0032119.9	XP_471950
DUF26-like protein	AAW34053
Chalcone synthase-like	CAA62921
OSJNBa0052P16.16	XP_474665
Putative TSPP	XP_450177

Da es wenige Proteomstudien von mit Arsen behandeltem Reis gibt und außerdem in diesen Studien nur wenige Proteinen identifiziert wurden, bei denen sich die Proteinmenge ändert, ist ein Vergleich mit Transkriptomstudien angestrengt worden [11-14], um die erzielten Ergebnisse besser einordnen zu können.

In der nachfolgenden Tabelle wurden diese Vergleiche zusammengefasst. Ein Großteil der unter Arsenstress in der Abundanz zur Kontrolle verschiedenen Proteine wurde in den Transkriptomstudien als nicht verändert identifiziert (52 bzw. 71%). Nur wenige dieser

Proteine zeigten eine entgegengesetzte Regulation. Betrachtet man die Proteine, deren Abundanz in die gleiche Richtung reguliert wurde wie in einer der Transkriptomstudien, so fällt auf, dass diese bei der Wurzelmessung über 40% ausmachen.

Tabelle zum Vergleich der Proteomdaten mit anderen Studien

	Spross		Wurzel	
	absolut	relativ	absolut	relativ
In die gleiche Richtung reguliert wie im Transkriptom	5	24%	98	42%
Entgegengesetzt reguliert wie im Transkriptom	1	5%	14	6%
In den Transkriptom-Studien nicht gefunden	15	71%	120	52%

Einige der Proteine, die nur in den Proteomdaten Veränderungen zeigten, unterliegen einer konstitutiven Genexpression (z.B. einige ribosomale Proteine) [86]. Sie werden also sehr wahrscheinlich nicht so sehr transkriptionell reguliert, sondern z.B. per RNA-Interferenz oder durch Proteindegradation.

6. DISKUSSION

6.1 Veränderte Keimung und Reduktion von Wurzel- und Sprosswachstum

Um die Auswirkungen von Arsenat auf Reispflanzen näher zu bestimmen, wurde die Wirkung verschiedener Arsenat-Konzentrationen auf die Keimungsrate von Reis und auf die Entwicklung von Keimlingen getestet. Der sehr geringe Effekt auf die Keimungsrate dürfte dadurch zu erklären sein, dass der Embryo bei und kurz nach der Keimung noch stark von seinem nicht durch Arsen vergifteten Endosperm zehrt und somit das im Medium befindliche Arsenat wenig Einfluss hat. Betrachtet man hingegen die Spross- und Wurzelentwicklung des wachsenden Keimlings, so zeigt sich, dass schon sehr geringe Mengen an Arsen, die so auch natürlicherweise vorkommen können [84, 85], eine starke Wachstumsreduktion in beiden Geweben auslösen.

Der Grund für die Wachstumsreduktion ist bisher nicht vollständig geklärt. Aber nicht nur in Keimlingen ist diese Reduktion beim Wachstum zu beobachten, auch wenn die Pflanzen zunächst in arsenfreiem Medium aufgezogen wurden und erst später Arsen ausgesetzt werden, kommt es zu einem reduzierten Spross- und Wurzelwachstum. Dies zeigt zum einen den direkten Effekt, den Arsen auf das Wachstum hat, und zum anderen, dass selbst Pflanzen, die einen ausgeglichenen Redoxhaushalt aufbauen können, vor den Effekten einer Arsenintoxikation nicht geschützt sind. Neben oxidativem Stress und den dadurch induzierten Änderungen im Redoxsystem der Pflanzen kommen auch Änderungen im Hormon- und Energiehaushalt als Ursache für ein reduziertes Pflanzenwachstum in Frage.

Da Arsenat durch Phosphattransporter in die Wurzel aufgenommen wird, ist anzunehmen, dass eine erhöhte Phosphatkonzentration den Effekt von Arsenat verringert. Hinweise darauf geben frühere Publikationen [87, 88] sowie Versuche zur Arsen-induzierten Wachstumsreduktion und deren teilweisen Reversion durch Zugabe von Phosphat. Ob dieser Effekt allerdings einer kompetitiven Hemmung bei der Arsenaufnahme geschuldet ist oder dem Ausgleich eines Phosphatmangels in der Pflanze, bleibt ungeklärt. Wie der Publikation Mühe, E.M., et al. [28] zu entnehmen ist, sind bei einer Intoxikation mit 100 μM Arsenat die gemessenen Phosphatkonzentrationen im Wurzelgewebe signifikant verändert. Auf der anderen Seite ändert sich in keinem Gewebe die Phosphatkonzentration signifikant bei einer Exposition zu 10 μM Arsenat. Da bereits eine Konzentration von 10 μM Arsenat eine klare Wachstumsreduktion in beiden Geweben auslöst, zeigt dies, dass nicht allein der Phosphatmangel für die Wachstumsreduktion verantwortlich ist [28]. Auf der anderen Seite wird aber deutlich, dass bei höheren Arsenkonzentrationen auch ein Phosphatmangel eine entscheidende Rolle spielen kann. Daher ist neben einer kompetitiven Hemmung der Phosphataufnahme und dem

darausfolgenden Phosphatmangel bei höheren Konzentrationen an Arsen auch eine bereits bei geringeren Arsenatkonzentrationen auftretende, mehr oder weniger direkte Wirkung von Arsenat auf das Wachstum sehr wahrscheinlich.

6.2 Phänotypische Veränderungen der Reisswurzel infolge einer Arsenintoxikation

Nach einigen Tagen Behandlung – abhängig von der Konzentration an Arsen, aber unabhängig vom Medium – verfärbten sich zunächst die oberen Teile der Wurzel braun. Die Verfärbung zeigte sich anfangs punktförmig, weitete sich mit der Zeit aber flächig aus.

Die einzige Verfärbung dieser Art, die bei Arsenintoxikation an Reis beobachtet und im Detail beschrieben wurde, sind sogenannte Eisen-Plaques. Diese entstehen insbesondere beim Nassreisanbau [89]. Durch Aerenchyma wird Luft in die Wurzeln transportiert, um bei sauerstoffarmen Bedingungen, wie sie in gefluteten Böden auftreten, die Sauerstoffversorgung aufrecht zu erhalten [33]. Das Austreten von Sauerstoff aus den Wurzeln in die Rhizosphäre bezeichnet man als radialen Sauerstoffverlust (ROL). Dabei kann es unter Ausfällung von im Wasser gelöstem Eisen durch den abgegebenen Sauerstoff zur Bildung von Eisen-Plaques kommen [90]. Eisen-Plaques bilden sich also stärker unter anaeroben Bedingungen aus, und zwar genau dann, wenn die Reispflanzen Sauerstoff längs der Wurzel in die Erde abgeben und Eisen oxidiert wird [33, 90].

Eisen-Plaques lassen sich jedoch als Grund für die Verfärbung ausschließen, die Behandlung mit Salzsäure und die Aufzucht von Reispflanzen in Medium ohne Eisen zeigen dies. Demnach war dies das erste Mal, dass dieser Phänotyp beobachtet wurde.

Dass dieser Phänotyp keine allgemeine Reaktion von Reis auf Stress oder Giftstoffe wie Schwermetalle darstellt, zeigt die Behandlung mit verschiedenen Schwermetallen.

Ein Vergleich der Zellwanddicke in den TEM-Bildern zwischen den Wurzeln behandelter und unbehandelter Reispflanzen zeigt eine Verdickung der Zellwand nach Arsenintoxikation. Neben der Möglichkeit, dass durch die Verdickung der Zellwände einfach die Lichtdurchlässigkeit verändert ist und die Wurzeln daher braun wirken, ist die Einlagerung oder Anlagerung einer färbenden Substanz anzunehmen. Die einzige Möglichkeit, die Komponenten, die diese Verfärbung auslösen, zu isolieren, ist die Inkubation in warmer Natronlauge über Nacht. Dies weist darauf hin, dass zumindest die Zellwandstruktur gebrochen werden muss, um den Farbstoff zu isolieren, und dieser folglich in die Zellwand integriert ist. Natronlauge und Hitze sind eine typische Wahl, um die Zellwandstruktur aufzuweichen [91]. Das Problem mit der Isolierung durch Natronlauge und Wärme ist, dass durch zu erwartende Modifikationen (z.B. Verseifungsreaktionen) die auf diese Weise extrahierten Metaboliten schwer zu identifizieren sind [92]. Da die färbende Substanz in Lösung gebracht werden konnte, ist aber auch klar, dass es sich bei

der Verfärbung nicht ausschließlich um die verringerte Lichtdurchlässigkeit einer Zellwandverdickung handelt. Die Färbung von Zellwandkomponenten mittels Etzold-Reagenz impliziert eine Änderung der Zellwandzusammensetzung mit mehr phenolischen Komponenten nach der Arsenbehandlung. Ob die Zellulose, die in der Kontrolle prominent ist, durch die Färbung der phenolischen Elemente in den behandelten Wurzeln nur maskiert ist oder in der Tat nicht vorhanden, lässt sich nicht mit Gewissheit sagen. Allerdings zeigt die Sudan-III-Färbung eine starke Zunahme an lipophilen Komponenten im Gegensatz zur Kontrolle. Die Lignin-Färbung zeigt keinerlei Ergebnisse und deutet zusammen mit der Sudan-III- und der Etzoldfärbung auf eine vermehrte Suberinkonzentration in der Zellwand hin, da Suberin aus phenolischen Elementen mit Lipidresten besteht [93] und daher von beiden Farbstoffen angefärbt wird. All diese Färbungen sind nicht ideal, da bei den Wurzeln zum einen schon eine Verfärbung vorliegt und zum anderen all diese Komponenten ja auch in den unbehandelten Pflanzen vorkommen. Daher wäre es notwendig, diese quantitativ zu untersuchen, um die genaue Ursache für die Verfärbung zu ergründen. Dennoch zeigt gerade die Sudan-III-Färbung eine wesentlich höhere Intensität bei den arsenbehandelten Pflanzen und färbt die komplette verdickte Zellwand an. Daher liefert die Färbung trotz allem einen starken Hinweis auf eine verstärkte Einlagerung an Suberin oder suberinartigen Substanzen in die Zellwand.

Die beobachteten Veränderungen in der Wurzel könnten einen Schutzmechanismus darstellen, vergleichbar demjenigen, der in Reis beobachtet wurde zum Schutz der Wurzeln vor Sulfiden [94]. Es konnte gezeigt werden, dass selbst bei geringen Sulfidmengen Reispflanzen eine Barriere aus Lignin und Suberin ausbilden. Die Vermutung liegt nahe, dass diese zum Schutz vor der Aufnahme von weiterem toxischem Sulfid ausgebildet wird. Doch die Frage, was eine Sulfid-Intoxikation mit einer Arsenintoxikation gemein hat, bleibt bestehen. Zum einen könnte es sich um eine allgemeinere Abwehrreaktion der Pflanze handeln, die das Eindringen von Toxinen verhindern soll. Dagegen spricht jedoch, dass bei allen anderen Behandlungen mit toxischen Metallen keine vergleichbare Reaktion beobachtet werden konnte. Eine interessante Hypothese ist daher, dass eine Arsenintoxikation sekundär zu einer Sulfidvergiftung führen könnte. Alle Prozesse bei der Arsenentgiftung und der Bekämpfung des oxidativen Stresses haben einen starken Effekt auf den Schwefelhaushalt. Ein erhöhter Verbrauch an Glutathion, Phytochelatin und Thioredoxinen sorgt für einen höheren Schwefelbedarf. Eventuell ist auch der Proteinumsatz ein Faktor, da wichtige Enzyme durch ROS oder Arsenit inaktiviert werden. Der Proteinumsatz wäre aber im Proteom nicht messbar, da ein Gleichgewicht von Synthese und Degradation besteht [57, 95]. Um diese inhibierten Proteine zu ersetzen, ist also eine weitere Fixierung von Schwefel notwendig. So ist es denkbar, dass durch den hohen Bedarf an Cystein und den verminderten Stoffwechsel bei der Schwefelfixierung auch das Zwischenprodukt Sulfid in größeren Mengen frei wird und so zu einer Sekundärvergiftung beiträgt.

6.3 Metabolomik und ihre Zuordnung

Auch die Metabolom-Daten belegen die enormen Änderungen im Schwefelstoffwechsel. So zeigt sich hier eine über 30fache Erhöhung der Cysteinsynthese schon bei vergleichsweise geringer Arsenbelastung von 10 μM im Vergleich zur Kontrolle. Auch alle anderen Aminosäuren werden verstärkt synthetisiert. Die Erhöhung von Phenylalanin als erstem Baustein für die Suberin- und Ligninsynthese und weiteren Sekundärmetaboliten unterstützt die Theorie der Zellwandmodifikation. Es fällt auf, dass viele Aminosäuren bei Arsenintoxikation vermehrt synthetisiert werden. Das wäre natürlich eine Notwendigkeit, um die durch Arsenit und ROS inhibierten Enzyme zu ersetzen. Eventuell zeigt sich hier aber zusätzlich der Versuch der Pflanze, möglichst alle Metabolite, die durch die Vergiftung betroffen sind, zu regenerieren. Durch eine erhöhte Aminosäuresynthese können zumindest Schwefel und Stickstoff aus den inhibierten und anschließend degradierten Proteinen wiederverwendet werden. Durch eine verminderte Photosynthese – angedeutet durch die geringere Abundanz von Proteinen aus der Photosynthese und auch in der Veröffentlichung von Liu, Y. [16] – wäre das Recyclen von Schwefel und Stickstoff umso dringlicher. Die Assimilation beider Elemente ist lichtabhängig reguliert [96, 97] und von der Ferredoxinreduktion abhängig, somit unmittelbar an die Photosynthese gekoppelt.

Zur Neusynthese von Aminosäuren sind Zwischenprodukte des Citratzyklus' sowie Acetyl-CoA unabdingbare Ausgangsprodukte. So ist die erhöhte Expression der Enzyme im Citratzyklus eventuell nicht nur nötig, um ein Energiedefizit auszugleichen, sondern auch, um die Aminosäuresynthese mit ihren Bausteinen zu versorgen [68]. Es wäre also denkbar, dass die Menge an Metaboliten gleich bleibt wie in den unbehandelten Kontrollen, aber durch die zusätzliche massive Synthese von Aminosäuren dennoch weniger Elektronen und ATP aus dem Citratzyklus der Atmungskette zur Verfügung gestellt werden können. Diese Überlegung wird gestützt durch die Metabolom-Daten, die keine signifikanten Veränderungen bei Metaboliten wie α -Ketoglutarat und der Brenztraubensäure zeigen. Neben Oxalacetat, 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat bilden sie jeweils die Grundbausteine für die Synthese bestimmter Aminosäuren [58].

Die Untersuchungen des Metaboloms zeigen auch eine größere Menge an Polysacchariden in den Wurzeln behandelter Pflanzen. Durch eine wie im Proteom implizierte verminderte Glykolyse würden diese Zucker nicht abgebaut und weiter angereichert. Interessanterweise scheint gerade Fructose und Glucose nicht angereichert zu sein. Eventuell werden diese aber direkt nach der Entstehung verstoffwechselt.

Raffinose ist ein Speicherpolysaccharid, das besonders in Stresssituationen gebildet wird [98]. Eventuell dient Raffinose neben seiner Funktion als Kohlenstoff- und Energiespeicher auch als Antioxidanz [99]. Das erhöhte Vorkommen eines Abbauprodukts des Ascorbatstoffwechsels untermauert die erhöhte Enzymabundanz, die im Proteom gezeigt werden konnte. Die erhöhte Menge an Shikimisäure gibt einen Hinweis darauf, dass

phenolische Elemente für die Änderungen in der Zellwandstruktur der Reiszurzel durch die Arsenatexposition mit verantwortlich sein könnten.

6.4 Übersicht über die durchgeführten Proteomikansätze und ihre Ergebnisse

Arsen ist eines der häufigsten Elemente der Erde und es ist für alle Lebewesen toxisch. Diese toxischen Eigenschaften näher zu bestimmen, erweist sich jedoch als schwierig [89]. Einer der wichtigsten Faktoren scheint oxidativer Stress zu sein, aber auch viele andere Effekte von Arsen werden für die Toxizität verantwortlich gemacht [27]. Die endgültige Wirkungsweise von Arsen auf Pflanzen gerade bei geringen Mengen ist allerdings nicht abschließend geklärt. Daher ist es wichtig, neue Ansatzpunkte zu finden und Methoden zu verwenden, die zunächst einen Überblick über die Veränderungen in der Pflanze liefern. Mit den daraus gewonnenen Erkenntnissen ist es dann möglich, gezielter ins Detail zu gehen. Nachdem einige Transkriptomanalysen diese Aufgabe bewerkstelligt haben, sollten durch Proteomuntersuchungen diese Ergebnisse unterstützt und erweitert werden. Mit der Langzeitbehandlung von Reis mit Arsen wurde dieses Ziel erreicht, es sind mehr als 232 in ihrer Abundanz veränderte Proteine in den Wurzeln identifiziert worden. Mit 21 veränderten Proteinen in den Sprossen dieser langzeitbehandelten Pflanzen wurde das Bild einer Langzeitbehandlung in Reis vervollständigt. Es zeigt ebenso wie bei den Untersuchungen des Phänotyps, dass der Effekt auf die Wurzeln der Pflanze wesentlich stärker ist als auf die Sprosse.

Durch die Kontrollen und die statistische Auswertung der Daten konnte ein relativ einfaches und schnelles Verfahren etabliert werden, mit dem man unterschiedliche Bedingungen auf Proteomebene direkt vergleichen kann.

Die Kurzzeitversuche zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinabundanz zwischen den Wurzeln behandelter und unbehalteter Reispflanzen. Dies ist einerseits sehr erstaunlich, andererseits unterstützt es die Langzeit-Ergebnisse, indem es verdeutlicht, dass die Daten sich nur bei einer behandlungsbedingten Veränderung von den Kontrollen abgrenzen lassen. Die Frage, warum keinerlei Änderungen nach 16 Stunden beobachtet werden konnten, bleibt dennoch bestehen. Die Änderungen im Transkriptom sind schon nach drei Stunden sichtbar [17], während in den (im Zuge dieser Arbeit) durchgeführten Untersuchungen nach 16 Stunden scheinbar keine Veränderung im Proteom stattfinden. Warum dies der Fall ist, lässt sich allerdings nur spekulieren. Eine schnelle und direkte Antwort auf Arsen ist zunächst natürlich in Bezug auf die Transporter und Mechanismen, die die Entgiftung steuern, zu erwarten. Zum einen wurden die Proteinextrakte mit Kernen und Zellorganellen angereichert, es ist also möglich, dass membranständige Proteine wie z.B. Transportproteine in den hier durchgeführten Proteommessungen nicht auftauchen. Zum anderen haben die Pflanzen besonders nach der Wachstumszeit von 8 Wochen gewisse Reserven, um Stresssituationen wie

kurzzeitigen Arsenstress auszugleichen. So ist es nicht erstaunlich, dass Prozesse wie ROS-Entgiftung, Energiestoffwechsel und Schwefel- bzw. Aminosäurehaushalt innerhalb von 16 h noch nicht gestört sind. Eventuell ist eine relativ geringe Exposition von 25 μM Arsen innerhalb von 16 h bei adulten Pflanzen nicht genug, um die vorhandenen Ressourcen zu verbrauchen, so dass eine globale Veränderung des Proteoms nicht notwendig war.

Es ist natürlich möglich, dass die Arsenantwort vorwiegend auf den direkt ausgelösten Veränderungen beruht. Damit sind Änderungen des Phosphat- und Schwefelhaushalts gemeint sowie die Entstehung von ROS und Stickstoffmonoxid [100]. Ein häufiger Signalweg gerade bei direkten und schnellen Antworten auf Stress sind posttranslationale Änderungen. Sie wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Auch Signalmoleküle wie Calcium, H_2O_2 und Inositoltrisphosphat bilden einen schnellen Weg, Veränderungen zu signalisieren und die notwendigen Gegenmaßnahmen zu induzieren, ohne dass diese im Proteom ersichtlich sind [101, 102]. Aber auch die möglichen Veränderungen von Transkriptionsfaktoren und ähnlichen Signalproteinen mögen durch die Schwankungen bei der Messung zwar detektiert worden sein, aber eventuell in einem zu geringen Maß, um diese aufzulösen. Durch den ähnlichen chemischen Charakter von Arsenat und Phosphat ist es geradezu wahrscheinlich, dass Proteinphosphorylierungen beeinträchtigt werden. Auch das wird in dem hier vorgestellten Ansatz nicht erfasst.

Bei einer Exposition der Pflanze für 8 Wochen kam es jedoch zu gravierenden Veränderungen. Diese liegen u.a. im Bereich der Aminosäuresynthese, was aufgrund des Verbrauchs von Glutathion während des Entgiftungsprozesses nicht verwunderlich ist. Darüber hinaus müssen durch Arsenit inhibierte Proteine neu synthetisiert werden. Aminosäuren können auch an sich wichtige Funktionen übernehmen, wie z.B. Prolin, das eine entgiftende Wirkung gegenüber Radikalen besitzt [100, 103]. Auch Änderungen im Redoxmetabolismus und bei Proteinen, die in die Stressantwort involviert sind, wurden schon durch Transkriptom-Daten angedeutet [67]. Bei einem verminderten Wachstum der Wurzeln scheinen auch Änderungen in der Zellorganisation und im Hormonstoffwechsel durchaus interessant [12, 100]. Auch die Veränderungen im Entgiftungsmechanismus für ROS bestätigen die Daten von Transkriptom-Untersuchungen. Ein veränderter Kohlenstoffmetabolismus und Veränderungen beim Elektronentransport sind durch die Atmungskette mit dem ATP-Pool verknüpft. Daher könnten die Daten nützliche Hinweise auf den Einfluss des Phosphatanalogs Arsenat auf diese Prozesse geben.

Änderungen im Sekundärmetabolismus sowie im Lipidstoffwechsel sind beschrieben worden und könnten unter anderem Ursachen für den beobachteten Wurzelphänotyp aufzeigen [12]. Außerdem ist der Lipidstoffwechsel eng verknüpft mit der Synthese einiger Hormone [60]. Änderungen bei der Photosynthese wurden schon des Öfteren gezeigt, auch die Inhibition der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCO) durch Arsenat ist bekannt und wahrscheinlich ein Grund für die reduzierte Photosyntheseleistung bei Arsenintoxikation [16]. Allerdings scheint das in einem Wurzelpräparat sehr erstaunlich. Dennoch ist durch die Messung reziproker Proben eine

Verunreinigung durch Blattmaterial fast ausgeschlossen. Die Verunreinigung mit Blattmaterial hätte jeweils vermehrt nur in den Referenzen der reziproken Proben stattfinden müssen. Außerdem müsste das Verhältnis der Verunreinigung in beiden Proben gleich sein. Dies ist insgesamt sehr unwahrscheinlich. Und selbst in diesem Fall wären die gemessenen Verhältnisse zwischen ^{15}N und ^{14}N bei allen Proteinen, die durch diese Verunreinigung gemessen worden wären, gleich oder ähnlich. Auch das ist nicht der Fall. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die gemessenen Proteine aus den in den Wurzeln vorhandenen Plastiden stammen. Diese sind in der Lage, die entsprechende mRNA und einige dieser Proteine zu synthetisieren [104, 105].

Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen Phosphatmangel und niedriger exprimierten Genen für Photosynthese-Prozesse in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen gezeigt [105]. Eine mögliche Verbindung zwischen Arsenat und Phosphatmangel ergibt sich durch die ähnlichen chemischen Eigenschaften von Phosphat und Arsenat.

Änderungen in der RNA-Regulation sind zwar schon beobachtet worden [29, 47], aber gerade im Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen sind sie äußerst spannend. Auch wenn einige dieser Prozesse schon beschrieben sind, bleiben die Erkenntnisse über Entgiftung, Angriffspunkte und Regulation bei Arsenintoxikation in Pflanzen unzureichend. Mit diesen Proteomik-Daten konnten also zum einen bestehende Vermutungen und Hypothesen unterstützt und zum anderen neue hinzugefügt werden. Dies ist der größte Proteomik-Datensatz in diesem Gebiet und er wird durch die vielen Übereinstimmungen mit anderen Studien in seinen Aussagen gestützt.

6.5 Proteomik und ihre Zuordnung

6.5.1 Änderungen im Energiestoffwechsel

Die Folgen von Arsenstress auf den Energiehaushalt sind weitgehend ungeklärt. Hierzu gibt es einige einzelne Versuche, die bestimmte Hypothesen erlauben, aber viele dieser Experimente wurden nicht an Pflanzenzellen durchgeführt. Andere beruhen auf einzelnen Enzymen mit einer veränderten Expression oder auf der Betrachtung isolierter Mitochondrien [73, 100, 106-108].

Die Atmungskette ist in den Wurzeln ein zentrales Element des Energiehaushalts. Sie überträgt Elektronen aus verschiedenen Quellen auf Sauerstoff. Zusammen mit zwei Protonen wird so Wasser gebildet, es handelt sich also letztlich um die energiereiche „Knallgasreaktion“. Die graduell gewonnene Energie wird von den einzelnen Komplexen der Atmungskette genutzt, um einen Protonengradienten zu erzeugen. Der Protonengradient wiederum wird durch ATPasen für die Phosphorylierung von ADP verwendet. Mit Elektronen versorgt wird die Atmungskette über den Citratzyklus, die Glykolyse oder die β -Oxidation. Die hier vorgestellten Daten weisen auf einen

verminderten Elektroneneintrag des Citratzyklus' unter Arsenstress hin. Durch die geringere Menge an Succinat-Dehydrogenase ist der direkte Elektronentransport vom Citratzyklus in die Atmungskette sehr wahrscheinlich vermindert. Auch die direkte Verknüpfung der Glykolyse mit der Atmungskette durch das Glycerin-3-Phosphat Shuttle ist gestört. Die verminderte Menge an GAPDH und der vorgeschalteten Aldolase führt vermutlich zu einer weiteren Verminderung der Elektronenzufuhr. Der indirekte Weg, die Atmungskette mit Elektronen zu versorgen, führt über das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat. Dies wird über die Pyruvat-Dehydrogenase in den Citratzyklus eingespeist. Es wurde in *Arabidopsis thaliana* gezeigt, dass eine Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ein direktes Ziel für eine Arsen-Vergiftung darstellt [109]. Die Proteine des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes werden sehr wahrscheinlich durch das Binden von Arsenit an die Thiolgruppen des Proteins gehemmt. Diese Hemmung entkoppelt die Glykolyse vom Citratzyklus und verhindert die Bildung von Acetyl-CoA. In den Proteomdaten dieser Arbeit werden Proteine des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes vermehrt exprimiert, was den Versuch einer Kompensation für den verminderten Umsatz an Pyruvat darstellen könnte.

Ein weiterer Angriffspunkt von Arsenat in der Glykolyse ist die Reaktion, die durch die GAPDH katalysiert wird [46]. Die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat mit Arsenat anstelle von Phosphat führt dazu, dass direkt 3-Phosphoglycerat gebildet wird. Auf diese Weise erfolgt allerdings keine ATP-Synthese, was somit zu einem weiteren Energieverlust führt [107]. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Versorgung der Atmungskette mit Elektronen und damit die Energieversorgung der Zelle unter Arsenstress umfassend konterkariert wird. Da der Arsenstress jedoch gleichzeitig zu einem erhöhten Energieverbrauch aufgrund der nötigen Entgiftungsmaßnahmen führt, ist dies für die Zelle ganz besonders problematisch.

Metabolische Prozesse wie Citratzyklus, Glykolyse und Atmungskette sind sehr eng miteinander verknüpft. Daher ist es möglich, dass Enzyme dieser Stoffwechselwege einander durch komplexe Regulationsmechanismen beeinflussen. Der Knotenpunkt in diesem Fall könnte die Inhibition der Pyruvat-Dehydrogenase sein. Durch die Inhibition und infolgedessen die verminderten Mengen an Acetyl-CoA wäre eine Regulation der anderen Enzyme denkbar. Leider ist das Wissen um die Effekte von Arsen auf diese Enzyme in Pflanzen sehr eingeschränkt. Daher sind weitere Untersuchungen der Metabolite und der Regulation dieser Stoffwechselwege notwendig.

Außer der veränderten Proteinmengen bei GAPDH, Aldolase, Succinat-Dehydrogenase und der Inaktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase sind weitere NADPH+H⁺-produzierende Enzyme des Cytosols betroffen. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym aus dem Pentosephosphatweg, ist bei Arsenstress weniger abundant. Sie hat eine wichtige Aufgabe bei oxidativem Stress und ist unter diesen Bedingungen normalerweise hochreguliert. Normalerweise liefert die Reaktion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) die Elektronen für die Regenerierung von Glutathion und für die Fettsäuresynthese [110]. Es wurde gezeigt, dass sich eine erhöhte Aktivität der G6PDH in

Stresssituationen positiv auswirkt [111]. Es ist wenig über die Regulation dieses Enzyms in Stresssituationen bekannt und auch die Mechanismen zur genauen Abstimmung mit der Fettsäuresynthese sind noch ungeklärt. Durch die Rolle in der ROS-Bekämpfung stellt die Expression dieses Enzyms einen wichtigen Faktor dar. Die in den Proteomdaten ermittelte verminderte Synthese dieses Enzyms könnte also auch eine Ursache für den Arsenat-induzierten oxidativen Stress sein. Es stellt sich hierbei natürlich die Frage, warum es zu dieser verringerten Abundanz kommt. Da die G6PDH den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert, ist sie, unter anderem auch transkriptionell, streng reguliert. Die vorausgehende Reaktion – sowohl für die Glykolyse als auch für den Pentosephosphatweg – ist das Phosphorylieren von Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch die Hexokinase [58]. Da dieser Reaktionschritt ATP benötigt, ist er bei einem allgemeinen Energiemangel eventuell vermindert. Möglicherweise werden die Enzyme wie die GAPDH und die G6PDH infolgedessen herunterreguliert, um sich diesem Mangel anzupassen. Interessanterweise ist das Enzym, das den nächsten Schritt des Pentosephosphatwegs katalysiert, die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, stark erhöht. Der Zweck könnte sein, das Produkt der G6PDH möglichst schnell zu verstoffwechseln und damit eine Rückreaktion zu verhindern. Trotz der allgemeinen Eindämmung des Energiestoffwechsels waren auch einige Enzyme des Citratzyklus' und der Glykolyse in der Abundanz erhöht, was unter anderem notwendig ist, um die Aminosäuresynthese und die Synthese anderer Metabolite aufrecht zu erhalten. Auch die Proteine, die Bestandteil der Atmungskette sind, zeigen eine erhöhte Expression mit Ausnahme einer auch in Wurzeln exprimierten, vorwiegend chloroplastischen ATPase (Quell: www.arabidopsis.org Tair). Allerdings gibt es in jenen Daten, die nicht ganz den hier angelegten Kriterien entsprechen, Hinweise, dass mehrere mitochondriale ATPase-Untereinheiten zumindest leicht hochreguliert sind. Interessant wäre hierbei allerdings die Umsatzrate der ATPasen.

Außer den Proteinen der Atmungskette zeigen auch die spannungsabhängigen Transporter in der äußeren Membran sowie ein Phosphattransporter durch die innere Membran verglichen mit der Referenz erhöhte Proteinmengen. Da auf diese Weise auch das Phosphat-Analogon Arsenat in die mitochondriale Matrix gelangen könnte, ist die Chance einer kompetitiven Hemmung der ATP-Synthese gegeben. *In vitro* Tests an Säuger-ATPasen zeigen sogar die Möglichkeit von Arsen als Substrat bei der ATP-Synthese auf [46, 49]. Um aussagen zu können, ob eine Änderung in der Proteinsynthese von ATPasen und den anderen mitochondrialen Proteinen eine Anpassung an Arsenat im Mitochondrium darstellen könnte, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Auf alle Fälle könnten die Veränderungen dieser Proteine auf ein Energiedefizit hindeuten.

Den Metabolom-Daten ist zu entnehmen, dass energiereiche Zucker in der Wurzel angereichert werden im Vergleich zu den Kontrollen. Dies ist eventuell ein weiterer Hinweis auf einen erhöhten Energiebedarf sowie auf eine reduzierte Glykolyse-Aktivität. Um dies näher zu charakterisieren, müsste der Ursprung der Polyzucker (Saccharose, Galactinol, Raffinose und Trehalose) ermittelt werden.

Die Photosynthese in den Blättern scheint reduziert zu sein. Alle identifizierten Photosyntheseproteine sind in Sprossextrakten weniger abundant. Dies wird auch durch eine weitere veröffentlichte Proteomstudie gestützt, besonders, wenn man die längste Exposition mit den Kontrollen vergleicht [16]. Somit könnte die Versorgung der Wurzeln mit Energie aus den Sprossen zumindest vermindert sein.

Wie erwähnt, ist eine weitere Elektronenquelle für die Atmungskette die β -Oxidation. In Pflanzen läuft diese vorwiegend in den Peroxisomen ab. Das erste Enzym ist eine Acyl-CoA-Oxidase, die Fettsäuren spaltet und als Nebenprodukt H_2O_2 generiert [60]. Das nachfolgende Enzym ist ein multifunktionales Protein, das mehrere Schritte in der β -Oxidation übernimmt und unter diesen Bedingungen leicht erhöht synthetisiert wird. Die abschließende Reaktion der β -Oxidation wird von der ebenfalls zweifach erhöhten 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase katalysiert. Für den Transport von Acetyl-CoA über die Mitochondrienmembran ist eine putative Carnitin-/Acylcarnitin-Translokase verantwortlich. Während des Fettsäureabbaus werden bis zu diesem Punkt pro Zyklus ein $FADH_2$ und ein $NADH+H^+$ gebildet. Durch den Transport und das Verstoffwechseln von dem entstandenen Acetyl-CoA kommen weitere Elektronendonatoren hinzu, die die Atmungskette mit Elektronen versorgen können [60]. Die erhöhte Expression von Proteinen der β -Oxidation und der Atmungskette sowie von einigen Enzymen des Citratzyklus könnte zu einer erhöhten Produktion von ROS-Molekülen führen. Die erhöhte β -Oxidation könnte also einen Ausgleich für die verringerte Glykolyse darstellen, um den Citratzyklus mit Substrat zu versorgen.

Die Auswirkungen von Arsen auf Mitochondrien sind in tierischen Systemen besser untersucht als in der Pflanze [73, 107]. Es ist aber klar, dass sowohl im tierischen als auch im pflanzlichen System die Mitochondrien und die in ihnen ablaufenden Prozesse durch Arsen beeinflusst werden [106]. So konnte gezeigt werden, dass mit Arsenit behandelte Mitochondrien eine erhöhte ROS-Produktion zeigen. Außerdem wurde deutlich, dass Arsenit die Komplexe I und II der Atmungskette inhibieren kann. Arsen kann die Öffnung von MPT-Poren auslösen und dadurch nicht nur den Protonengradienten und damit die Atmungskette beeinflussen, sondern schlussendlich sogar Apoptose auslösen [73]. In *H. verticillata* zeigte die Behandlung mit Arsenat, dass die Metaboliten ATP, $NADP^+$ und $NADH+H^+$ im Vergleich zur Kontrolle niedriger konzentriert waren. Im Gegensatz wiesen ADP, $NADPH+H^+$ und NAD^+ erhöhte Konzentrationen auf [100]. Das deutet zusammen mit den hier vorgestellten Proteomik-Daten auf einen Einfluss von Arsenat auf die ATP-Synthese innerhalb der Mitochondrien hin. Die erhöhte $NADPH+H^+$ Konzentration würde außerdem die Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase erklären. $NADPH+H^+$ ist ein potenter Hemmstoff für dieses Enzym und somit des ganzen Pentosephosphatweges. Außerdem zeigt es einen Zusammenhang von mit Arsen behandelten Mitochondrien und einer erhöhten ROS-Produktion auf.

6.5.2 Arsen induzierter oxidativer Stress und die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Es wurde schon oft vermutet, dass die toxischen Effekte, die durch Arsen ausgelöst werden, zum großen Teil auf oxidativem Stress beruhen [112]. Diese Theorie wird unterstützt durch Studien, die arsenresistente und arsenempfindliche Pflanzen vergleichen. Es wurde ein Zusammenhang beobachtet zwischen der Resistenz von Pflanzen gegen Arsen und der Kapazität ihres Entgiftungsapparats bzw. der Arsenaufnahmerate [57, 103, 113]. Die Aufnahme wiederum ist im Falle von Arsenat abhängig von der Phosphatmenge im Medium und der Regulation und Affinität der Phosphat-Transporter [36]. Also ist die Resistenz zum einen abhängig von der Menge an Glutathion und Phytochelatinen und damit von der Schwefel- und Aminosäure-Versorgung, zum anderen von der Regulation der Arsenaufnahme durch die Pflanze. Durch eine verminderte Arsenaufnahme kann der Entgiftungsmechanismus resistenter Pflanzen die Arsenmenge und die bei der Entgiftung entstehenden Nebenprodukte wie z.B. ROS unter Kontrolle halten [53].

Es ist daher sehr schwierig, Effekte, die durch Arsen ausgelöst werden, und Effekte, die durch ROS ausgelöst werden, voneinander zu trennen. Gesichert ist, dass bestimmte Mechanismen, die zur Bekämpfung von oxidativem Stress wichtig sind, unter Arseneinwirkung intensiviert werden. Ebenso werden die an Entgiftungsprozessen beteiligten Enzyme bei Arsenintoxikation verstärkt synthetisiert [89], wie auch die Daten dieser Arbeit bestätigen. Die enge Verknüpfung mit dem Schwefelstoffwechsel [113] und den Elektronendonatoren GSH und $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ erschweren die Unterscheidung zwischen oxidativem Stress und Arsenentgiftung weiter. Mit Glutathion als zentralem Molekül sowohl für die Arsenentgiftung als auch für die Bekämpfung von oxidativem Stress liegt die Vermutung nahe, dass diese Verbindung – also das Aufbrauchen des Glutathions durch die Arsenentgiftung – ein Auslöser für oxidativen Stress sein könnte, selbst wenn das Arsen an sich keine weitere Freisetzung von ROS verursachen würde [67]. Einige Studien ziehen Parallelen zwischen der Entstehung von oxidativem Stress in Säugerzellen und der Entstehung von ROS in der Pflanze. Hierbei sollen bei der Umwandlung von Arsenat zu Arsenit Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, so dass Radikale entstehen [29]. Allerdings scheint keine Studie diesen Zusammenhang direkt zu zeigen. Im Falle der ROS-Bildung bei der Umwandlung von Arsenat zu Arsenit wäre dies eine zusätzliche Belastung für den Pool an Antioxidantien. Daher wäre die endgültige Ursache für eine dauerhaft zu hohe Belastung durch ROS eine zu langsame Regeneration des Antioxidantienpools.

Sowohl Transkriptomik als auch die Proteomik und Metabolom-Studien in dieser Arbeit zeigen eine breite Übereinstimmung bei dem Einfluss von Arsen auf den Redox-Metabolismus. Der Verbrauch von Antioxidantien bzw. die Inaktivierung wichtiger Enzyme dieser Stoffwechselwege [15, 100, 103, 114] scheint ein entscheidender Effekt von Arsen zu sein. Die Pflanze gleicht diese Verluste eventuell durch vermehrte Expression der

beteiligten Enzyme aus. Außer einer erhöhten Proteinsynthese in diesen Stoffwechselbereichen wurden auch erhöhte Mengen an Ascorbat und Glutathion bei mit Arsen gestressten Reispflanzen gefunden [100].

Dieser Trend wurde auch durch die Langzeitmessung bestätigt, da wichtige Redox-Proteine wie Thioredoxin-Peroxidase und Ascorbat-Peroxidase sowie die Glutathion-S-Transferasen eine veränderte Abundanz zeigen.

All die Effekte, die Arsen auf die Mitochondrien hat, haben sowohl Auswirkungen auf die Regeneration als auch auf die Synthese von Antioxidantien wie Ascorbat, Thioredoxin oder Glutathion. Dies ist der Fall, da die Elektronen für die Regeneration ursprünglich von Cytochromen oder NAD(P)H+H⁺ bereitgestellt werden [60]. Die Synthese von Glutathion und Thioredoxinen wird durch einen Mangel an ATP beeinflusst. So ist es weiterhin unklar, ob der Mangel an Antioxidantien oder die arseninduzierten Änderungen an mitochondrialen Proteinen und dem assoziierten Energiestoffwechsel ROS auslösen. Eventuell ist auch die Summe all dieser Änderungen im Metabolismus dafür verantwortlich. Es ist aber klar, dass Änderungen in diesen wichtigen Systemen zu einer Kettenreaktion führen können, die die ganze Pflanze beeinflusst.

Dies sind die ersten Ergebnisse einer vergleichenden Proteomstudie, die ohne 2D-Gele gemacht wurde. Auf diese Weise kann eine sehr große Anzahl an veränderten Proteinen gleichzeitig identifiziert werden. Das hat den Vorteil, dass ein kompletteres Bild präsentiert werden kann. Besonders zeigt sich dies in den hier beschriebenen Stoffwechselwegen, denn nur sehr wenige der hier beschriebenen Proteine wurden bisher in anderen Studien als verändert wahrgenommen. In Transkriptionsstudien wurden einige dieser Enzyme in Reis nicht als verändert detektiert. Allerdings ist eine Langzeitexposition in dieser Art auch nie zuvor Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Des Weiteren sind die Enzyme der erwähnten Stoffwechselwege nicht nur transkriptionell reguliert, sondern – da eine sehr schnelle Regulation oft sehr wichtig ist – auch posttranskriptional oder Substrat-abhängig [60, 68].

6.5.3 Epigenetische Effekte bei Arsenintoxikation

In Pflanzen ist die Betrachtung von epigenetischen Effekten von Arsen noch ganz am Anfang. In Säugetiermodellen hingegen sind die Effekte von Arsenverbindungen auf die Epigenetik besser aufgeklärt [115, 116]. Die toxische Wirkung von Arsen auf Menschen und Tiere wurde lange Zeit untersucht und gerade die kanzerogenen Effekte von Arsen stehen bis heute im Fokus. Die Auswirkungen von Arsenintoxikation auf DNA sind immer noch nicht vollständig geklärt. Außer dem indirekten Schaden, der durch ROS an der DNA verursacht werden kann, wurden epigenetische Effekte beobachtet. Histonmodifikationen, Veränderungen der microRNAs und sowohl der globalen als auch genspezifischen DNA-Methylierung wurden als Effekte von Arsen beobachtet [116]. Im Tiermodell konnte ein

Zusammenhang von chronischen Krankheiten wie Diabetes und Krebserkrankungen mit arseninduzierten Änderungen der DNA-Methylierung gezeigt werden [115, 116].

Die Untersuchung von Qingpo Liu et al. zeigt Arsenit-bedingte Veränderungen verschiedener miRNAs in Reis. Hierbei wird auch der Bezug zu einigen Veränderungen im Transkriptom dargestellt, die ausschließlich durch Arsenit hervorgerufen werden [117]. Auch in der Studie von Yu, L. J., et al. wurden Änderungen gezeigt, die teilweise sogar abhängig sind von der Art des Gewebes und der Dauer der Behandlung [16].

Im Bezug auf epigenetische Veränderungen, die speziell auf Arsenat oder Arsenit zurückzuführen sind, wurden bisher keine weiteren Untersuchungen veröffentlicht. Daher sind Studien notwendig, um die Spezifität dieser Veränderungen und ihre Auswirkungen auf den Metabolismus zu ermitteln. In Fall der Proteomdaten haben sich Veränderungen gezeigt, die die Histonmodifikation beeinflussen können. Hierbei sind eine Histondeacetylase sowie die Histone an sich niedriger exprimiert als in der Referenz.

Ein Protein, das eventuell verwandt ist mit dem Histon-bindenden Protein FVE/MSI4, ist auf die gleiche Weise verändert. FVE/MSI4 ist Teil eines Komplexes zur Deacetylierung von Histonen [118]. Niedriger exprimiert ist auch Argonaut 4, ein Protein, das bei Histon- und DNA-Methylierung eine Rolle spielt [119, 120].

Die Methylierung von DNA ist indirekt verknüpft mit dem Schwefelstoffwechsel. Das Coenzym für die meisten Methylierungsreaktionen ist S-Adenosylmethionin (SAM). Methionin ist als einer der beiden Grundbausteine für dieses Molekül unerlässlich für seine Synthese. Als zweite schwefelhaltige proteinogene Aminosäure neben Cystein ist es an den Schwefelmetabolismus gebunden. Dabei wird Cystein für die Synthese von Methionin benötigt. Der andere Grundbaustein ist ATP. Somit sind beide Grundbausteine für dieses Coenzym indirekt mit Stoffwechselwegen verknüpft, die durch Arsenat beeinträchtigt werden. Die Verknüpfung zwischen einer veränderten DNA-Methylierung und S-Adenosylmethionin wurde bei Säugerzellen schon mehrmals beschrieben [116]. Die Veränderungen könnten natürlich auf eine verringerte Verfügbarkeit von SAM zurückzuführen sein. Allerdings ist die Verknüpfung in diesem Fall eine unmittelbare, da zum Entgiftungsprozess in Säugetieren die Methylierung von Arsen gehört. In Pflanzen ist diese Art der Arsenmodifikation eher unwahrscheinlich [34]. Die Art der Entgiftung in Pflanzen stellt allerdings einen Verbrauch der Grundelemente für dieses Coenzym dar. Das hierbei verbrauchte GSH und die Phytochelatine könnten zu einer Verschiebung im Schwefel- und ATP-Stoffwechsel führen. In der Proteom-Analyse von Ahsan, N. et al. [15] sowie in den hier vorgestellten Proteomdaten sind die S-Adenosylmethionin-Synthetasen in ihrer Expression stark erhöht. SAM ist aber auch das Coenzym in weiteren Reaktionen, z. B. bei der Synthese von Lignin-Monomeren, ebenso ist SAM der Grundbaustein in der Ethylensynthese.

6.5.4 Veränderungen im Hormonhaushalt

Es ist schon mehrfach gezeigt worden, dass Hormone in der Antwort auf abiotischen Stress eine wichtige Rolle spielen [59]. Im Falle von Arsen wäre es interessant zu wissen, wie spezifisch diese Antwort ist.

Hormone sind wichtige Signalmoleküle in der Pflanzenentwicklung und vielen anderen wichtigen Prozessen. Es scheint also möglich zu sein, dass einige der Effekte, die Arsen auf Pflanzen hat, hormonell gesteuert werden. In der Tat wurden einige Veränderungen bei den Transkripten von in die Hormonsynthese und die Hormonsignalwege involvierten Enzymen beobachtet [12, 121].

Als ein Phytohormon, das wichtige Aufgaben übernimmt, um die Abwehr von biotischem und abiotischem Stress zu induzieren, ist Jasmonat auch bei Arsenstress involviert. Starke Veränderungen bei der Jasmonatsynthese hängen direkt mit der β -Oxidation sowie dem Lipidstoffwechsel zusammen. In den Messungen dieser Arbeit ist die Proteinmenge aller Proteine, die mit Jasmonsäure in Verbindung gebracht werden können, erhöht. Interessanterweise zeigt sich bei den Lipoxygenasen, wie wichtig es sein kann, Organe getrennt voneinander zu untersuchen. In der Wurzel wurde eine 9S-Lipoxygenase (LOX5) identifiziert, die hochreguliert ist. Das passt gut zu der für Lipoxygenasen und ihre elektrophilen Produkte postulierten Rolle in der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress [122, 123]. Betrachtet man hingegen Proben aus dem Spross, so ist die dort identifizierte 13S-Lipoxygenase (LOX 2) stark herunterreguliert.

Cytokinine stellen eine weitere wichtige Hormongruppe, die unter anderem das Wachstum und die Zellteilung positiv beeinflusst. Die Homöostase von Cytokinin wird, so vermutet man, durch Synthese, Abbau, aber auch durch Modifikationen reguliert. Die Wirksamkeit des Hormons wird durch Modifikationen verringert oder ganz aufgehoben. Ein Beispiel für eine solche Modifikation ist das Konjugieren von Zucker an verschiedenen Seitengruppen [124]. Zwei der Enzyme, die für diese Reaktion verantwortlich sein können, sind in den in dieser Arbeit beschriebenen Messungen stark erhöht.

Brassinosteroide steuern die Zellteilung und -streckung, die Differenzierung der Zellen so wie Seneszenz und Stressreaktionen. Ein Protein das eventuell mit dem Brassinoidrezeptor BRI1 (*brassinosteroid insensitive 1*) interagiert, zeigt geringe Veränderungen in der Abundanz. Allerdings bindet dieses Protein an die DNA und könnte damit zur Brassinoid-Signal-Übertragung beitragen. Ein weiteres Protein, eIF3i (*eukaryotic translation initiation factor*), zeigt ebenfalls eine Abnahme in der Proteinmenge bei Arsenintoxikation. Es konnte gezeigt werden, dass die Untereinheit von eIF3 mit dem Protein TGF- β (*transforming growth factor β*) interagiert. Die Expression dieser Untereinheit TRIP-1 (*TGF- β receptor interacting protein-1*) oder eIF3i wird in *Arabidopsis* durch Brassinosteroide reguliert [125]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TRIP-1 wahrscheinlich mit BRI1 interagiert und eventuell phosphoryliert wird. Außerdem ist eine

Funktion in den von Brassinosteroiden gesteuerten Wachstums- und Differenzierungsvorgängen möglich [126].

Eventuell könnten diese Änderungen in Hormonsynthese und -regulation Hinweise darauf liefern, wie die Wachstumsinhibition ausgelöst wird. Die Frage nach Ursache und Wirkung könnte hierbei wichtige Grundlagen zur Verbesserung des Ertrags auf arsenbelasteten Böden geben. Es wäre denkbar, dass aufgrund des Energiedefizits im Zuge der Stressbekämpfung das Wachstum mittels der Hormone aktiv gehemmt wird. Es wäre aber auch denkbar, dass einige dieser Prozesse durch direkte Inhibition von Schlüsselenzymen oder durch den Mangel an Metaboliten ausgelöst werden.

6.5.5 Anpassungen in der Translation an Arsenstress

eIF (*eukaryotic translation initiation factor*)-Proteine haben wichtige Funktionen bei der Translation von mRNA zu Protein. Sie initiieren diesen Prozess auf verschiedene Arten. Wie zuvor erwähnt, ist die Expression einer der Untereinheiten eventuell sogar abhängig von Brassinosteroiden. Ebenso wie dieses Protein sind auch die weiteren Proteine dieser Familie, die in der Proteomik-Analyse quantifiziert worden sind, herunterreguliert (LOC_Os03g18510.1, LOC_Os03g55150.1).

Ribosomale Proteine sind ein weiteres wichtiges Element für die Translation. Ribosomen sind aus Protein und RNA zusammengesetzte Komplexe und bilden die Verknüpfungsstelle, an der die Information der mRNA zu Protein translatiert wird. Sie werden unterteilt in eine kleine Untereinheit (40S) und die große Untereinheit (60S). Die Proteinsynthese ist ein energieintensiver Prozess. Die ebenso energieintensive Entgiftung und andere Prozesse zur Anpassung und Abwehr sind allerdings bei Stress überlebensnotwendig. Daher ist es nicht weiter erstaunlich, dass die Pflanze nur die nötigsten Proteine synthetisiert. Es scheint daher nicht verwunderlich, dass alle ribosomalen Proteine, die analysiert wurden, ebenfalls niedriger exprimiert sind als in der Referenz. Wang, J., et al. konnten zeigen, dass verschiedene Arten von Stress das Expressionsmuster der ribosomalen Proteine unterschiedlich beeinflusst [127]. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass auf diese Weise eine stressspezifische Proteinantwort initiiert werden kann. Auch der Einfluss des ribosomalen Proteins S60 rpl32 auf die Methylierung der DNA konnte in *Arabidopsis* gezeigt werden [128].

Da es zu diesen Änderungen und möglichen Regulationsmechanismen der Proteinsynthese allerdings wenige Studien gibt, kann nur spekuliert werden, welchen Einfluss das Expressionsmuster dieser ribosomalen Proteine auf die Stressantwort hat. Es scheint allerdings klar zu sein, dass ribosomale Proteine mehr regulatorisches Potential besitzen als zunächst angenommen [127].

6.5.6 Sekundärmetabolismus und die Anpassung der Zellwand

Im Sekundärmetabolismus werden Moleküle hergestellt, die nicht direkt zum Überleben notwendig sind. Diese sogenannten Sekundärmetabolite dienen verschiedensten Aufgaben, z.B. bei der Abwehr von Pathogenen und Herbivoren oder zum Schutz vor Licht oder Wasserverlust. Stoffe wie Lignin, Anthocyane, Suberin, Tannine oder Gifte wie Nicotin bestehen aus Monomeren oder Polymeren solcher Sekundärmetabolite. Die arseninduzierten Änderungen im Primärstoffwechsel haben auch Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel. Die Sekundärmetabolite werden aus Bausteinen des Primärstoffwechsels gebildet und sind schon auf diese Weise direkt betroffen. In der Transkriptomstudie von Huang, T.L., et al. zeigt sich außerdem eine direkte Verbindung mit Enzymen zur Zellwandbildung und dem Ligninstoffwechsel [14]. Auch bei dem hier gemessenen Proteomik-Ansatz zeigten sich Änderungen bei Enzymen der Lignin-Synthese und dem Stoffwechsel anderer Zellwandbestandteile. Die Zellwand ist eine wichtige Barriere für alle Nährstoffe, aber auch für Metalle und Pathogene. Es wurde schon kontrovers diskutiert, ob die Zellwand eventuell einen Abwehrmechanismus gegen Schwermetalle darstellt. Hierbei binden die Metalle an die Zellwandbestandteile oder deren Seitengruppen, wodurch ein Transport in die Zelle verhindert wird. Berichte von Änderungen der Zellwand durch Cadmium und Aluminium sind bekannt, ob sie allerdings für die Entgiftung relevant sind, ist nicht geklärt [129, 130].

6.5.7 Weitere in der Abundanz veränderte Proteine und die Hürden bei der Zuordnung

Einige weitere Proteine wurden in dem Langzeit-Proteomikansatz als in ihrer Abundanz verändert identifiziert. Es wird notwendig sein, diese Daten weiter zu analysieren und experimentelle Ansätze für das Untermauern und Erweitern dieser Daten zu finden. Eventuell lassen sich auf diese Weise weitere Proteine aus diesem Datensatz in einen Zusammenhang bringen. Einige Proteine wie Annexin (LOC_Os02g51750.1) und die kleinen G-Proteine RAS (*Rat sarcoma*) (LOC_Os03g59590.1, LOC_Os01g37800.1) deuten einen Zusammenhang mit Calcium als Signalmolekül an. Des Weiteren sind einige Proteine in Zellorganisation und -entwicklung involviert. Prozesse wie Proteindegradation, Stressantwort und Transport sind beeinflusst. Außerdem sind einige Proteine betroffen, die derzeit noch nicht zugeordnet werden können.

Die Zuordnung beruht häufig auf Analogien mit Proteinen besser studierter Organismen wie *Arabidopsis*. Die Zuordnungen von Datenbanken wie Uniprot, MapMan oder RiceCyc können auch nur so akkurat sein wie die aktuelle Datenlage es zulässt. Es ergibt sich ein einigermaßen vollständiges Bild, das aber durch Ausbau der Datenbanken, weitere Erkenntnisse und Versuche vertieft werden muss, um die Prozesse vollständig zu verstehen. In dieser Arbeit konnten die meisten Hypothesen zu oxidativem Stress und

Änderungen des Energiemetabolismus' auf Proteomebene bestätigt und erweitert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, wie nützlich, gut durchführbar und umfassend diese Form des *metabolic labeling* ist, um Fragestellungen wie diese auf Proteomebene zu untersuchen.

Auf alle Fälle wäre gerade aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Phosphat und Arsenat eine Untersuchung des Phosphoproteoms sehr interessant. Das Gleiche gilt für die Gegenüberstellung von mit Arsenat und mit Arsenit behandelten Pflanzen. Dies würde weitere Einblicke in die Regulation ermöglichen und zur Klärung der Frage beitragen, ob die Effekte auf den Energiehaushalt ausschließlich auf der Analogie zwischen Arsenat und Phosphat beruhen.

6.6 Resümee

Die Untersuchung des Proteoms zeichnet ein umfassendes Bild von den Folgen, den Entgiftungsmechanismen und den Regulationen, die durch Arsenat ausgelöst werden. Der beobachtete Phänotyp und die Metabolom-Untersuchung unterstützen und vervollständigen dieses Bild in beeindruckender Weise. Dies ist umso bemerkenswerter, als die Behandlungsdauer und die angewendeten Konzentrationen nicht übereinstimmen. Ein Vergleich mit den verfügbaren Transkriptom- und Proteomdaten unterstreicht die Richtigkeit unserer Messungen. Leider ist nur eine sehr begrenzte Anzahl an Proteomstudien verfügbar und in den verfügbaren Studien wurden nur wenige veränderte Proteine identifiziert. Dies liegt unter anderem an der sehr arbeitsintensiven Auftrennung und dem quantitativen Vergleich mittels 2D-Proteingelen, die in diesen Studien verwendet wurden. Durch die in dieser Arbeit etablierte und angepasste Methodik konnte eine wesentlich größere Anzahl an in der Abundanz veränderten Proteinen bei Arsenstress in Reis identifiziert werden. Das komplettere Bild, das entsteht, wenn man diese Proteine in den Stoffwechsel einordnet, ermöglicht einen noch einfacheren funktionellen Vergleich mit Daten aus Transkriptomstudien. Dieser Vergleich zeigt neben einigen Übereinstimmungen in der Regulationsrichtung bestimmter in der Menge variierender Proteine auch eine Vielzahl an Proteinen, die zuvor nicht als in ihrer Menge verändert detektiert werden konnten. Gerade in Bereichen wie dem Energie- und Hormonhaushalt, aber auch den epigenetischen Veränderungen in der Pflanze war bisher nichts oder nur sehr wenig bekannt. Der Vergleich mit den verfügbaren Transkriptom-Daten hat aber auch gezeigt, dass ein Großteil der beobachteten Veränderungen und die Regulationsrichtung trotz verschiedener Parameter in den Versuchsdurchführungen übereinstimmen. Dazu gehören Änderungen im Aminosäure-, Schwefel- und Redoxstoffwechsel.

Die durch Arsen ausgelöste Verschiebung im Redoxhaushalt der Pflanzen hat einen weitreichenden Effekt auf die ROS-Entgiftung und den Schwefelhaushalt. Zusammen mit den hier gemessenen Daten lässt sich ein direkter oder indirekter Effekt der ROS-Entgiftung auf die Energiereserven der Pflanze vermuten. Durch die ähnlichen

Eigenschaften von Arsenat und Phosphat ist es außerdem möglich, dass der Einfluss auf Stoffwechselwege wie die Glykolyse und die ATP-Synthese durch die direkte Verwendung von Arsenat anstelle von Phosphat ausgelöst wird.

Der große Bedarf an Schwefelverbindungen könnte ein Auslöser für den hier beobachteten Phänotyp sein. Die Frage, warum die Behandlung mit anderen toxischen Metallen/Metalloiden diesen Phänotyp dann nicht auch auslöst, müsste dennoch geklärt werden. Denn z.B. auch Cadmium induziert oxidativen Stress und damit alle Abwehrreaktionen und wird mittels Phytochelatinen entgiftet [129]. Allerdings findet man bei sehr genauer Betrachtung der Proteomdaten eine bei Arsenstress in ihrer Abundanz um das 3,8fache erhöhte Sulfitreduktase (LOC_Os05g42350.1) die Theorie der Sulfid-Intoxikation unterstützt. Diese ist in den Ergebnissen nicht aufgeführt, da nicht alle Peptide den vorgegebenen Ionscore aufweisen. Das bedeutet allerdings nicht das diese Peptide nicht diese Proteine beschreiben, sondern nur, dass die Wahrscheinlichkeit dafür, dass dieses Peptid genau diesem Protein zugeordnet werden kann unter 95% liegt. Von daher und da es durch mehr als ein Peptid charakterisiert wird, ist es immer noch ein Hinweis auf die Veränderung bei der Schwefelassimilation, die eventuell so erhöht ist, dass es zur Freisetzung von Sulfid und damit zu einer Intoxikation kommt. Klare Änderungen im Sekundärmetabolismus deuten auf Lignin und, damit verwandt, auf Suberin hin, was wiederum den Weg zu arseninduzierten Zellwandveränderungen weist. Diese sind auch in den TEM-Bildern klar zu erkennen. Metabolite wie Phenylalanin und Shikimisäure sind erhöht und stehen für die Synthese von Lignin- oder Suberinmonomeren bereit. Die Metabolomdaten unterstützen auch die erwarteten Veränderungen bei der ROS-Entgiftung und beim Aminosäure-Stoffwechsel, die im Proteom zu erkennen sind.

So greifen diese Studien ineinander und geben ein Bild, das weiter ausgebaut werden und durch andere Studien weiter gestützt werden muss.

Das Alleinstellungsmerkmal einer Arsenintoxikation scheint zu sein, dass dieses Metalloid den Metabolismus der Pflanze auf den verschiedensten Ebenen zugleich torpediert: Wie Cadmium löst Arsen oxidativen Stress aus, wie Blei bindet es an aktive Zentren cystein-abhängiger Enzyme und obendrein bietet es ein Substrat für Phosphat-verarbeitende Enzyme, die durch die ungewollten Reaktionen mit Arsenat permanent Energie verschwenden. Das Gesamtbild der Vorgänge während einer Arsenintoxikation, das in dieser Studie gezeichnet werden kann, zeigt derart schwerwiegende und multiple Angriffe auf den Energie- und Redoxmetabolismus der Pflanze, dass es wenig verwunderlich ist, dass die Pflanze dem letztlich wenig entgegenzusetzen hat und weit schwerere Einbußen hinnehmen muss als bei der Vergiftung durch andere Metalle und Metalloide. Umso wichtiger sind diese Erkenntnisse somit für die Züchtung und Entwicklung neuer Sorten.

Am Ende können diese Erkenntnisse also helfen, Pflanzen gezielt so zu züchten oder zu modifizieren, dass sie den widrigen Bedingungen auf arsenkontaminierten Ackerflächen widerstehen, Arsen nicht länger in den Spross transportieren oder gar die Aufnahme gänzlich unterbinden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Quellenangabe

1. Bluck, L. and D.A. Volmer, *The Role of Naturally Occurring Stable Isotopes in Mass Spectrometry, Part III: Small Gas Molecule Calculations*. Spectroscopy (Springf), 2009. **24**(9): p. 34.
2. Murashige, T. and F. Skoog, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**(3): p. 473-497.
3. Abedin, M.J., et al., *Arsenic accumulation and metabolism in rice (Oryza sativa L.)*. Environ Sci Technol, 2002. **36**(5): p. 962-8.
4. Nickson, R., et al., *Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater*. Nature, 1998. **395**(6700): p. 338.
5. van Geen, A., et al., *Impact of irrigating rice paddies with groundwater containing arsenic in Bangladesh*. Sci Total Environ, 2006. **367**(2-3): p. 769-77.
6. Chauhan, V.S., et al., *Ground water geochemistry of Ballia district, Uttar Pradesh, India and mechanism of arsenic release*. Chemosphere, 2009. **75**(1): p. 83-91.
7. Kapaj, S., et al., *Human health effects from chronic arsenic poisoning--a review*. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2006. **41**(10): p. 2399-428.
8. Bhattacharya, P., et al., *Groundwater chemistry and arsenic mobilization in the Holocene flood plains in south-central Bangladesh*. Environ Geochem Health, 2009. **31 Suppl 1**: p. 23-43.
9. Dhuldhaj, U.P., et al., *Microbial interactions in the arsenic cycle: adoptive strategies and applications in environmental management*. Rev Environ Contam Toxicol, 2013. **224**: p. 1-38.
10. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 227-32.
11. Chakrabarty, D., et al., *Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings*. Chemosphere, 2009. **74**(5): p. 688-702.
12. Yu, L.J., et al., *Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (Oryza sativa)*. New Phytol, 2012. **195**(1): p. 97-112.
13. Norton, G.J., et al., *Rice-arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis*. J Exp Bot, 2008. **59**(8): p. 2267-76.
14. Huang, T.L., et al., *Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots*. Plant Mol Biol, 2012. **80**(6): p. 587-608.
15. Ahsan, N., et al., *Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress*. Proteomics, 2008. **8**(17): p. 3561-76.
16. Liu, Y., et al., *Comparative proteomic analysis of rice shoots exposed to high arsenate*. J Integr Plant Biol, 2013. **55**(10): p. 965-78.
17. Mukherjee, A., et al., *Arsenic contamination in groundwater: a global perspective with emphasis on the Asian scenario*. J Health Popul Nutr, 2006. **24**(2): p. 142-63.
18. Williams, P.N., et al., *Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure*. Environ Sci Technol, 2005. **39**(15): p. 5531-40.

19. Abedin, M.J., J. Feldmann, and A.A. Meharg, *Uptake kinetics of arsenic species in rice plants*. Plant Physiol, 2002. **128**(3): p. 1120-8.
20. Smith, A.H., E.O. Lingas, and M. Rahman, *Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency*. Bull World Health Organ, 2000. **78**(9): p. 1093-103.
21. Meharg, A.A. and M.M. Rahman, *Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: implications for rice contribution to arsenic consumption*. Environ Sci Technol, 2003. **37**(2): p. 229-34.
22. Uddin, R. and N.H. Huda, *Arsenic poisoning in bangladesh*. Oman Med J, 2011. **26**(3): p. 207.
23. Abernathy, C.O., D.J. Thomas, and R.L. Calderon, *Health effects and risk assessment of arsenic*. J Nutr, 2003. **133**(5 Suppl 1): p. 1536S-8S.
24. Debapriya Mondal and D.A. Polya, *Rice is a major exposure route for arsenic in Chakdaha block, Nadia district, West Bengal, India: A probabilistic risk assessment*. Applied Geochemistry, 2008.
25. Hussam, A. and A.K. Munir, *A simple and effective arsenic filter based on composite iron matrix: development and deployment studies for groundwater of Bangladesh*. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2007. **42**(12): p. 1869-78.
26. Voegelin, A., et al., *Solid-phase characterisation of an effective household sand filter for As, Fe and Mn removal from groundwater in Vietnam*. Environmental Chemistry, 2014. **11**(5): p. 566-578.
27. Finnegan, P.M. and W. Chen, *Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 182.
28. Muehe, E.M., et al., *Are rice (Oryza sativa L.) phosphate transporters regulated similarly by phosphate and arsenate? A comprehensive study*. Plant Mol Biol, 2014. **85**(3): p. 301-16.
29. Hartley-Whitaker, J., G. Ainsworth, and A.A. Meharg, *Copper- and arsenate-induced oxidative stress in Holcus lanatus L. clones with differential sensitivity*. Plant Cell and Environment, 2001. **24**(7): p. 713-722.
30. Liu, W.J., et al., *Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (Oryza sativa L.)*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(18): p. 5730-6.
31. Ranathunge, K., et al., *Stagnant deoxygenated growth enhances root suberization and lignifications, but differentially affects water and NaCl permeabilities in rice (Oryza sativa L.) roots*. Plant Cell Environ, 2011. **34**(8): p. 1223-40.
32. Lee, C.-H., et al., *Iron plaque formation and its effect on arsenic uptake by different genotypes of paddy rice*. Plant and Soil, 2013. **363**(1-2): p. 231-241.
33. Wu, C., et al., *Do radial oxygen loss and external aeration affect iron plaque formation and arsenic accumulation and speciation in rice?* J Exp Bot, 2012. **63**(8): p. 2961-70.
34. Lomax, C., et al., *Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms*. New Phytol, 2012. **193**(3): p. 665-72.
35. Wang, X.J., et al., *Arsenic binding to iron(II) minerals produced by an iron(III)-reducing Aeromonas strain isolated from paddy soil*. Environ Toxicol Chem, 2009. **28**(11): p. 2255-62.
36. Jiang, W., et al., *Evaluation of potential effects of soil available phosphorus on soil arsenic availability and paddy rice inorganic arsenic content*. Environ Pollut, 2014. **188**: p. 159-65.

37. Mosa, K.A., et al., *Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants*. *Transgenic Res*, 2012. **21**(6): p. 1265-77.
38. Ma, J.F. and N. Yamaji, *Silicon uptake and accumulation in higher plants*. *Trends in Plant Science*, 2006. **11**(8): p. 392-397.
39. Meharg, A.A. and L. Jardine, *Arsenite transport into paddy rice (*Oryza sativa*) roots*. *New Phytologist*, 2003. **157**(1): p. 39-44.
40. Bienert, G.P., et al., *A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes*. *BMC Biol*, 2008. **6**: p. 26.
41. Ma, J.F., et al., *Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 9931-5.
42. Jander, G. and E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie, mit Ausnahme der quantitativen Analyse*. 1962: S. Hirzel.
43. Holleman, A.F., E. Wiberg, and N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 1995: de Gruyter.
44. Zhao, F.J., et al., *Arsenic uptake and metabolism in plants*. *New Phytol*, 2009. **181**(4): p. 777-94.
45. Tawfik, D.S. and R.E. Viola, *Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity*. *Biochemistry*, 2011. **50**(7): p. 1128-34.
46. Hughes, M.F., *Arsenic toxicity and potential mechanisms of action*. *Toxicol Lett*, 2002. **133**(1): p. 1-16.
47. Rosas-Castor, J.M., et al., *Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): a review*. *Sci Total Environ*, 2014. **488-489**: p. 176-87.
48. Ralph, S.J., *Arsenic-Based Antineoplastic Drugs and Their Mechanisms of Action*. *Metal-Based Drugs*, 2008. **2008**.
49. Gresser, M.J., *ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(12): p. 5981-3.
50. Duan, G.-L., et al., *A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase*. *New Phytologist*, 2007. **174**(2): p. 311-321.
51. Radabaugh, T.R., et al., *Arsenate reductase II. Purine nucleoside phosphorylase in the presence of dihydrolipoic acid is a route for reduction of arsenate to arsenite in mammalian systems*. *Chem Res Toxicol*, 2002. **15**(5): p. 692-8.
52. Nemeti, B., I. Csanaky, and Z. Gregus, *Effect of an inactivator of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a fortuitous arsenate reductase, on disposition of arsenate in rats*. *Toxicol Sci*, 2006. **90**(1): p. 49-60.
53. Tripathi, R.D., et al., *Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants*. *Trends Biotechnol*, 2007. **25**(4): p. 158-65.
54. Moore, K.L., et al., *High-resolution secondary ion mass spectrometry reveals the contrasting subcellular distribution of arsenic and silicon in rice roots*. *Plant Physiol*, 2011. **156**(2): p. 913-24.
55. Whitbread, A.K., et al., *Characterization of the omega class of glutathione transferases*. *Methods Enzymol*, 2005. **401**: p. 78-99.
56. Dixon, D.P., B.G. Davis, and R. Edwards, *Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 30859-69.
57. Dave, R., et al., *Arsenite tolerance is related to proportional thiolic metabolite synthesis in rice (*Oryza sativa* L.)*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2013. **64**(2): p. 235-42.
58. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. 3rd ed. 2004, New York: J. Wiley & Sons.

59. Taiz, L. and E. Zeiger, *Plant physiology*. 5th ed. 2010, Sunderland, MA: Sinauer Associates. xxxiv, 782, 137 p.
60. *Front-matter*, in *Plant Biochemistry (Fourth Edition)*, H.-W. Heldt and B. Piechulla, Editors. 2011, Academic Press: San Diego. p. i-iii.
61. Drose, S., *Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1827**(5): p. 578-87.
62. Sharma, P., et al., *Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions*. *Journal of Botany*, 2012. **2012**: p. 26.
63. Bhattacharjee, S., *The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants*. *Journal of Botany*, 2012. **2012**: p. 22.
64. Saha, J., et al., *Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants*. *Frontiers in Environmental Science*, 2015. **3**.
65. Dixon, D.P., A. Laphorn, and R. Edwards, *Plant glutathione transferases*. *Genome Biol*, 2002. **3**(3): p. REVIEWS3004.
66. Ribas, V., C. Garcia-Ruiz, and J.C. Fernandez-Checa, *Glutathione and mitochondria*. *Front Pharmacol*, 2014. **5**: p. 151.
67. Sharma, I., *Arsenic induced oxidative stress in plants*. *Biologia*, 2012. **67**(3): p. 447-453.
68. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W.H. Freeman.
69. Sirover, M.A., *On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1810**(8): p. 741-51.
70. Muller, F.L., et al., *High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates*. *Biochem J*, 2008. **409**(2): p. 491-9.
71. Zaffagnini, M., et al., *Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties*. *Front Plant Sci*, 2013. **4**: p. 450.
72. Sirover, M.A., *Subcellular Dynamics of Multifunctional Protein Regulation: Mechanisms of GAPDH Intracellular Translocation*. *Journal of cellular biochemistry*, 2012. **113**(7): p. 2193-2200.
73. Hosseini, M.J., et al., *Toxicity of Arsenic (III) on Isolated Liver Mitochondria: A New Mechanistic Approach*. *Iran J Pharm Res*, 2013. **12**(Suppl): p. 121-38.
74. Chen, W., et al., *The metabolic acclimation of Arabidopsis thaliana to arsenate is sensitized by the loss of mitochondrial LIPOAMIDE DEHYDROGENASE2, a key enzyme in oxidative metabolism*. *Plant Cell Environ*, 2014. **37**(3): p. 684-95.
75. Arsova, B., S. Kierszniowska, and W.X. Schulze, *The use of heavy nitrogen in quantitative proteomics experiments in plants*. *Trends Plant Sci*, 2012. **17**(2): p. 102-12.
76. Engelsberger, W.R., et al., *Metabolic labeling of plant cell cultures with K(15)NO3 as a tool for quantitative analysis of proteins and metabolites*. *Plant Methods*, 2006. **2**: p. 14.
77. Plahl, W., *Zum Nachweis verholzter Pflanzenmembranen mit Phloroglucin und Salzsäure*. *Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel*, 1931. **62**(5): p. 603-606.
78. Weckwerth, W., K. Wenzel, and O. Fiehn, *Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks*. *Proteomics*, 2004. **4**(1): p. 78-83.
79. Popov, N., et al., *[Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]*. *Acta Biol Med Ger*, 1975. **34**(9): p. 1441-6.

80. Borchert, N., et al., *Proteogenomics of *Pristionchus pacificus* reveals distinct proteome structure of nematode models*. *Genome Res*, 2010. **20**(6): p. 837-46.
81. Rappsilber, J., M. Mann, and Y. Ishihama, *Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(8): p. 1896-906.
82. Kierszniowska, S., D. Walther, and W.X. Schulze, *Ratio-dependent significance thresholds in reciprocal ¹⁵N-labeling experiments as a robust tool in detection of candidate proteins responding to biological treatment*. *Proteomics*, 2009. **9**(7): p. 1916-24.
83. Thimm, O., et al., *MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes*. *Plant J*, 2004. **37**(6): p. 914-39.
84. Smedley, P.L. and D.G. Kinniburgh, *A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters*. *Applied Geochemistry*, 2002. **17**(5): p. 517-568.
85. Hohmann, C., et al., *Anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria show as resistance and immobilize as during Fe(III) mineral precipitation*. *Environ Sci Technol*, 2010. **44**(1): p. 94-101.
86. Eisenberg, E. and E.Y. Levanon, *Human housekeeping genes are compact*. *Trends Genet*, 2003. **19**(7): p. 362-5.
87. Swarnakar, A. and S. Mukherji, *Amelioration of arsenic toxicity by phosphate salts in mungbean seedlings*. *J Environ Biol*, 2005. **26**(3): p. 551-5.
88. Jankong, P., P. Visoottiviseth, and S. Khokiattiwong, *Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land*. *Chemosphere*, 2007. **68**(10): p. 1906-12.
89. Meharg, A.A. and F.J. Zhao, *Arsenic & Rice*. Springer Science & Business Media, 2012.
90. Tripathi, R.D., et al., *Roles for root iron plaque in sequestration and uptake of heavy metals and metalloids in aquatic and wetland plants*. *Metallomics*, 2014. **6**(10): p. 1789-1800.
91. Cheng, Y.-S., et al., *Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010. **162**(6): p. 1768-1784.
92. Kiyota, E., P. Mazzafera, and A.C.H.F. Sawaya, *Analysis of Soluble Lignin in Sugarcane by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with a Do-It-Yourself Oligomer Database*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(16): p. 7015-7020.
93. Schreiber, L., et al., *The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix)*. *J Exp Bot*, 2005. **56**(415): p. 1427-36.
94. Armstrong, J. and W. Armstrong, *Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe²⁺ and water uptake, and lateral root emergence*. *Ann Bot*, 2005. **96**(4): p. 625-38.
95. Dwivedi, S., et al., *Arsenate exposure affects amino acids, mineral nutrient status and antioxidants in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes*. *Environ Sci Technol*, 2010. **44**(24): p. 9542-9.
96. Koprivova, A., et al., *Do PFT1 and HY5 interact in regulation of sulfate assimilation by light in *Arabidopsis*?* *FEBS Lett*, 2014. **588**(7): p. 1116-21.
97. Jonassen, E.M., D.C. Sevin, and C. Lillo, *The bZIP transcription factors HY5 and HYH are positive regulators of the main nitrate reductase gene in *Arabidopsis* leaves, NIA2, but negative regulators of the nitrate uptake gene NRT1.1*. *J Plant Physiol*, 2009. **166**(18): p. 2071-6.

98. Saito, M. and M. Yoshida, *Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress*. Journal of Plant Physiology, 2011. **168**(18): p. 2268-2271.
99. ElSayed, A.I., M.S. Rafudeen, and D. Gollmack, *Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress*. Plant Biology, 2014. **16**(1): p. 1-8.
100. Tripathi, R.D., et al., *Arsenomomics: omics of arsenic metabolism in plants*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 275.
101. Mazzucotelli, E., et al., *Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription*. Plant Science, 2008. **174**(4): p. 420-431.
102. Yun, K.Y., et al., *Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress*. BMC Plant Biol, 2010. **10**: p. 16.
103. Tripathi, P., et al., *Arsenite tolerance in rice (Oryza sativa L.) involves coordinated role of metabolic pathways of thiols and amino acids*. Environ Sci Pollut Res Int, 2013. **20**(2): p. 884-96.
104. Isono, K., et al., *Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in Arabidopsis thaliana roots*. Plant Physiol, 1997. **114**(2): p. 623-30.
105. Kang, J., et al., *Suppression of Photosynthetic Gene Expression in Roots Is Required for Sustained Root Growth under Phosphate Deficiency*. Plant Physiol, 2014. **165**(3): p. 1156-1170.
106. Wickes, W.A. and J.T. Wiskish, *Arsenate Uncoupling of Oxidative Phosphorylation in Isolated Plant Mitochondria*. Functional Plant Biology, 1976. **3**(2): p. 153-162.
107. Crane, R.K. and F. Lipmann, *The effect of arsenate on aerobic phosphorylation*. J Biol Chem, 1953. **201**(1): p. 235-43.
108. Requejo, R. and M. Tena, *Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 1**: p. S156-62.
109. Chen, W., et al., *Disruption of ptLPD1 or ptLPD2, genes that encode isoforms of the plastidial lipoamide dehydrogenase, confers arsenate hypersensitivity in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2010. **153**(3): p. 1385-97.
110. Salvemini, F., et al., *Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2750-7.
111. Dal Santo, S., et al., *Stress-Induced GSK3 Regulates the Redox Stress Response by Phosphorylating Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Arabidopsis*. The Plant Cell, 2012. **24**(8): p. 3380-3392.
112. Requejo, R. and M. Tena, *Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity*. Phytochemistry, 2005. **66**(13): p. 1519-1528.
113. Rai, A., et al., *Arsenic tolerances in rice (Oryza sativa) have a predominant role in transcriptional regulation of a set of genes including sulphur assimilation pathway and antioxidant system*. Chemosphere, 2011. **82**(7): p. 986-95.
114. Zagorchev, L., et al., *A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 7405-32.
115. Bustaffa, E., et al., *Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity*. Arch Toxicol, 2014. **88**(5): p. 1043-67.
116. Bailey, K.A. and R.C. Fry, *Arsenic-Associated Changes to the Epigenome: What Are the Functional Consequences?* Curr Environ Health Rep, 2014. **1**: p. 22-34.

117. Liu, Q. and H. Zhang, *Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(26): p. 6524-36.
118. Xu, Y., et al., *A Matrix Protein Silences Transposons and Repeats through Interaction with Retinoblastoma-Associated Proteins*. Current Biology. **23**(4): p. 345-350.
119. Zilberman, D., et al., *Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats*. Curr Biol, 2004. **14**(13): p. 1214-20.
120. Zilberman, D., X. Cao, and S.E. Jacobsen, *ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation*. Science, 2003. **299**(5607): p. 716-9.
121. Fu, S.F., et al., *Transcriptome profiling of genes and pathways associated with arsenic toxicity and tolerance in Arabidopsis*. BMC Plant Biol, 2014. **14**: p. 94.
122. Mueller, M.J. and S. Berger, *Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling*. Phytochemistry, 2009. **70**(13-14): p. 1511-21.
123. Farmer, E.E. and M.J. Mueller, *ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling*. Annu Rev Plant Biol, 2013. **64**: p. 429-50.
124. Wang, J., et al., *N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 2011. **52**(12): p. 2200-13.
125. Jiang, J. and S.D. Clouse, *Expression of a plant gene with sequence similarity to animal TGF-beta receptor interacting protein is regulated by brassinosteroids and required for normal plant development*. Plant J, 2001. **26**(1): p. 35-45.
126. Ehsan, H., et al., *Interaction of Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein*. Plant J, 2005. **43**(2): p. 251-61.
127. Wang, J., et al., *Expression changes of ribosomal proteins in phosphate- and iron-deficient Arabidopsis roots predict stress-specific alterations in ribosome composition*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 783.
128. Mukhopadhyay, P., et al., *Stress-mediated alterations in chromatin architecture correlate with down-regulation of a gene encoding 60S rpl32 in rice*. Plant Cell Physiol, 2013. **54**(4): p. 528-40.
129. Xiong, J., et al., *Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall*. Planta, 2009. **230**(4): p. 755-765.
130. Yang, J.L., et al., *Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex*. Plant Physiol, 2008. **146**(2): p. 602-11.

8. ANHANG

Die Proteomdaten sind im Anhang in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet, im Einzelnen sind dort die in ihrer Abundanz veränderten Proteine mit ihrer Identifikation und ihrer Einordnung in Stoffwechselwege gezeigt. Darüber hinaus finden sich dort u.a. auch der Vergleich mit publizierten Transkriptomdaten, die \log_2 -Werte der jeweiligen reziproken Messungen, die Uniprot-ID sowie die LOC ID. Auch die normalisierten Messdaten für die quantitative Metabolomuntersuchung sind im Anhang (Tabelle 4) detailliert aufgeführt. In Tabelle 1 finden sich die Daten zu den in Material und Methoden in Abbildung 8 verglichenen technischen Replikaten.

8.1 Vergleich zweier technischer Replikate

Tabelle 3: Vergleich zweier technischer Replikate

uniProt id	Log ₂ Werte Messung 1a	Log ₂ Werte Messung 1b	Mittelwert	Nur Proteine mit minimal 2 Peptiden in jeder Messung			
Q10PD0_ORYSJ	-2.33	-2.56	-2.44	Peptide mit Mascotscore >31			
Q9AS12_ORYSJ	-1.91	-1.97	-1.94	Strengere Kriterien, da Messung 1a in Hohenheim gemessen wurde			
Q6ZEZ7_ORYSJ	-1.72		-1.72	Messung 1b wurde zusammen mit der reziproken Messung in Tübingen gemessen			
Q8H5T5_ORYSJ	-1.65	-1.61	-1.63				
Q0DFW1_ORYSJ	-1.64	-1.35	-1.50				
Q9AV77_ORYSJ	-1.60	-0.63	-1.11	Q851P9_ORYSJ	-0.93	-1.18	-1.06
Q6Z4N6_ORYSJ	-1.48	-2.90	-2.19	Q6K1Q6_ORYSJ	-0.92	-0.67	-0.79
Q6H7T1_ORYSJ	-1.31	-0.83	-1.07	Q8H8S1_ORYSJ	-0.88	-0.56	-0.72
Q94JJ0_ORYSJ	-1.29	-0.55	-0.92	Q6AV23_ORYSJ	-0.86	-1.53	-1.19
Q10LN7_ORYSJ	-1.24	-0.52	-0.88	Q10MS5_ORYSJ	-0.84	-0.32	-0.58
Q8RUI4_ORYSJ	-1.11	-0.95	-1.03	Q2QLR2_ORYSJ	-0.84	-1.21	-1.03
Q5N725_ORYSJ	-1.05	-1.61	-1.33	Q7XEQ3_ORYSJ	-0.83	-0.85	-0.84
Q6AVS5_ORYSJ	-1.05	-1.31	-1.18	Q0D3W6_ORYSJ	-0.81	-1.20	-1.01
Q0JAI2_ORYSJ	-1.04	-0.36	-0.70	Q6YY64_ORYSJ	-0.80	-0.90	-0.85
RS16_ORYSJ	-1.02	-0.55	-0.78	Q6YUR8_ORYSJ	-0.79	-1.88	-1.33
PIP13_ORYSJ	-0.99	-1.24	-1.12	CB23_ORYSJ	-0.78	-0.91	-0.85
Q7XR19_ORYSJ	-0.98	-0.90	-0.94	Q0D4P5_ORYSJ	-0.77	-0.69	-0.73
B7F573_ORYSJ	-0.75	-0.06	-0.40	Q5ZDJ3_ORYSJ	-0.75	-0.49	-0.62

Q6Z6A7_ORYSJ	-0.70	-1.47	-1.09	Q0DZE3_ORYSJ	-0.31	-0.68	-0.50
Q7XJB4_ORYSJ	-0.67	-0.80	-0.74	Q10LR6_ORYSJ	-0.31	-0.78	-0.55
Q5W6H1_ORYSJ	-0.66	-1.25	-0.95	Q6ZC70_ORYSJ	-0.30	-1.30	-0.80
G3PC_ORYSJ	-0.66	-0.86	-0.76	Q84M35_ORYSJ	-0.30	-0.67	-0.48
Q0DRW2_ORYSJ	-0.65	-0.82	-0.73	Q6Z7B0_ORYSJ	-0.29	-0.27	-0.28
Q7XSV2_ORYSJ	-0.63	-1.30	-0.97	Q0IP84_ORYSJ	-0.29	-0.26	-0.27
Q6Z537_ORYSJ	-0.63	-0.12	-0.37	Q6K5G8_ORYSJ	-0.29	-0.46	-0.37
Q0D868_ORYSJ	-0.59	-0.79	-0.69	H2A2_ORYSJ	-0.27	-0.28	-0.28
Q6H547_ORYSJ	-0.58	-0.75	-0.66	Q10LF8_ORYSJ	-0.27	-0.83	-0.55
Q0JDZ7_ORYSJ	-0.56	-0.66	-0.61	Q6Z720_ORYSJ	-0.26	-0.05	-0.15
EF1A_ORYSJ	-0.56	-0.59	-0.58	RS132_ORYSJ	-0.25	-0.65	-0.45
H2AV1_ORYSJ	-0.55	-0.44	-0.50	Q6I608_ORYSJ	-0.23	-0.44	-0.34
Q8LH97_ORYSJ	-0.55	-0.57	-0.56	Q6Z105_ORYSJ	-0.23	-0.58	-0.40
Q6H4V4_ORYSJ	-0.52	-0.14	-0.33	Q0J0I3_ORYSJ	-0.23	-0.70	-0.46
Q0D852_ORYSJ	-0.52		-0.52	H2B9_ORYSJ	-0.22	-1.05	-0.64
Q8H588_ORYSJ	-0.52		-0.52	Q0DBE3_ORYSJ	-0.19	-0.63	-0.41
Q0J878_ORYSJ	-0.52	-0.53	-0.52	Q0E4R7_ORYSJ	-0.18	-0.26	-0.22
Q0DFD6_ORYSJ	-0.47	-0.63	-0.55	Q2QNF3_ORYSJ	-0.18	-0.64	-0.41
Q6K5R6_ORYSJ	-0.47	-0.33	-0.40	ASPRX_ORYSJ	-0.17	-0.58	-0.37
Q0PVB0_ORYSJ	-0.47	-0.65	-0.56	Q7EYK9_ORYSJ	-0.16	0.12	-0.02
B7EI57_ORYSJ	-0.46	-0.31	-0.38	Q7XQZ5_ORYSJ	-0.11	-0.81	-0.46
DHSA_ORYSJ	-0.44	-0.40	-0.42	ACT1_ORYSJ	-0.10	0.06	-0.02
H33_ORYSJ	-0.43	-0.70	-0.57	Q60EY9_ORYSJ	-0.10	-0.02	-0.06
Q0ITK1_ORYSJ	-0.43	-0.32	-0.38	SUS2_ORYSJ	-0.10	-0.73	-0.41
Q6H4L2_ORYSJ	-0.42	-0.55	-0.49	Q5N7W3_ORYSJ	-0.09	-0.46	-0.27
Q5WMY3_ORYSJ	-0.40	-0.45	-0.43	ORYA_ORYSJ	-0.07	0.61	0.27
Q2R1J8_ORYSJ	-0.39	-0.58	-0.49	Q5ZEN1_ORYSJ	-0.06	-0.68	-0.37
Q0J9F5_ORYSJ	-0.39	-1.15	-0.77	Q5JKH1_ORYSJ	-0.06	-1.01	-0.53
Q5SNJ4_ORYSJ	-0.38	-0.11	-0.25	Q8S1V1_ORYSJ	-0.05	-0.74	-0.39
Q0E2Q7_ORYSJ	-0.37	-0.30	-0.33	Q6K4T1_ORYSJ	-0.02	-0.56	-0.29
Q0JQB1_ORYSJ	-0.36	-0.04	-0.20	PIP12_ORYSJ	0.01	0.10	0.05
ALF_ORYSJ	-0.31	-0.25	-0.28	Q6AVI0_ORYSJ	0.03	-0.81	-0.39

Q75J18_ORYSJ	0.03	-0.72	-0.34	Q10E23_ORYSJ	0.60	0.88	0.74
Q0D9G9_ORYSJ	0.04	-0.12	-0.04	Q5WMX0_ORYSJ	0.63	0.75	0.69
Q0J9K2_ORYSJ	0.05	0.04	0.04	IF4A1_ORYSJ	0.64	0.07	0.35
Q94CU3_ORYSJ	0.05	0.31	0.18	Q0DAL0_ORYSJ	0.65	0.47	0.56
Q7XKB5_ORYSJ	0.06	-0.54	-0.24	Q9FXT8_ORYSJ	0.66	0.58	0.62
B7F6J5_ORYSJ	0.06	-0.53	-0.23	PDI11_ORYSJ	0.66	0.77	0.72
Q0E4Q0_ORYSJ	0.07	-0.74	-0.34	O80414_ORYSJ	0.67	0.47	0.57
Q0JNK3_ORYSJ	0.10	-0.76	-0.33	Q2QS14_ORYSJ	0.67		0.67
CATA2_ORYSJ	0.12	-0.08	0.02	CALR_ORYSJ	0.69	0.62	0.65
Q10PS4_ORYSJ	0.12	0.03	0.08	Q10Q21_ORYSJ	0.69	0.34	0.52
HS24M_ORYSJ	0.14		0.14	ATPBM_ORYSJ	0.69	0.73	0.71
Q7XUC9_ORYSJ	0.16	-0.43	-0.13	SCRK2_ORYSJ	0.73	0.50	0.61
Q10KY7_ORYSJ	0.19	0.34	0.26	Q7XV86_ORYSJ	0.74	0.87	0.80
Q6Z3X5_ORYSJ	0.21	0.12	0.17	Q0DKL7_ORYSJ	0.75		0.75
Q651T8_ORYSJ	0.23	0.25	0.24	APX1_ORYSJ	0.75	-0.13	0.31
Q7FAH2_ORYSJ	0.27	0.34	0.31	Q0D3E0_ORYSJ	0.75	0.66	0.70
Q6K4K9_ORYSJ	0.29	0.43	0.36	Q0E3Z1_ORYSJ	0.77	0.48	0.63
Q10N98_ORYSJ	0.29	0.56	0.43	Q5JMU8_ORYSJ	0.77	0.65	0.71
SALT_ORYSJ	0.34	0.77	0.56	Q7Y1F0_ORYSJ	0.78	0.29	0.53
SUS1_ORYSJ	0.35	0.21	0.28	Q0JC94_ORYSJ	0.80	0.46	0.63
GBLPA_ORYSJ	0.36	0.79	0.58	Q0J0U8_ORYSJ	0.83	1.09	0.96
Q75HJ3_ORYSJ	0.40	1.12	0.76	Q6EUD7_ORYSJ	0.85	0.30	0.58
Q5TKF4_ORYSJ	0.42	-0.15	0.14	Q10MK9_ORYSJ	0.88	0.80	0.84
PIP21_ORYSJ	0.42	0.57	0.50	Q53NM9_ORYSJ	0.90	0.59	0.75
ATPAM_ORYSJ	0.43	0.61	0.52	Q84P96_ORYSJ	0.92	1.16	1.04
Q851Y8_ORYSJ	0.49	0.54	0.51	Q6H6C7_ORYSJ	0.93	2.16	1.55
Q0JP92_ORYSJ	0.54	0.78	0.66	Q0J5J5_ORYSJ	0.93	0.73	0.83
ENO_ORYSJ	0.54	0.27	0.41	Q7G3Y4_ORYSJ	0.98	0.60	0.79
Q9ASE0_ORYSJ	0.55	0.29	0.42	VDAC5_ORYSJ	1.02	1.14	1.08
ADT_ORYSJ	0.55	0.39	0.47	Q5WAB4_ORYSJ	1.02	0.37	0.69
RAN2_ORYSJ	0.57	0.74	0.66	Q6F361_ORYSJ	1.06	0.70	0.88
Q2QXR8_ORYSJ	0.59		0.59	CLH1_ORYSJ	1.08	0.59	0.84

Q6Z6L4_ORYSJ	1.13	0.79	0.96
RL102_ORYSJ	1.14	0.43	0.79
MFP_ORYSJ	1.14	0.82	0.98
Q10RP0_ORYSJ	1.15	0.87	1.01
Q2QLY4_ORYSJ	1.20		1.20
VDAC1_ORYSJ	1.21	1.04	1.13
Q10NA9_ORYSJ	1.23	1.32	1.28
Q0ISV7_ORYSJ	1.25	0.92	1.09
OMT1_ORYSJ	1.27	1.11	1.19
Q75IS1_ORYSJ	1.29	1.19	1.24
Q0E2K1_ORYSJ	1.33	1.16	1.24
Q6YPG2_ORYSJ	1.36	0.70	1.03
MDHC_ORYSJ	1.38	0.38	0.88
Q6H5B5_ORYSJ	1.52	0.68	1.10
Q0DZE5_ORYSJ	1.57	1.13	1.35
Q7EYR6_ORYSJ	1.69	1.58	1.64
RGP1_ORYSJ	1.76	1.09	1.42
Q0JJQ7_ORYSJ	1.79	1.80	1.80
Q6Z4E4_ORYSJ	1.83		1.83

Q8LMW8_ORYSJ	1.96	1.23	1.60
METK2_ORYSJ	2.19	1.97	2.08
Q0JJ25_ORYSJ	2.23	2.29	2.26
Q7XTT6_ORYSJ	2.36	2.00	2.18
TRXH1_ORYSJ	2.57	3.62	3.09
Q6H798_ORYSJ	2.99	2.92	2.95
Q84MN8_ORYSJ	2.99	4.72	3.85
AKR3_ORYSJ	-0.21	4.96	2.38
Q2R4A1_ORYSJ	-0.63	0.88	0.12
Q84QT9_ORYSJ	-1.43	0.89	-0.27
Q8RUJ2_ORYSJ	-0.54	5.96	2.71
Q945W6_ORYSJ	-0.32	5.52	2.60
Q9FUE4_ORYSJ	-1.02	6.34	2.66
Q6ZEE7_ORYSJ	-1.72	3.78	1.03
Q93VD4_ORYSJ	-0.18	4.75	2.29
CYSK1_ORYSJ	0.04	3.61	1.83
OPR1_ORYSJ	0.85	5.49	3.17
Ausreißer			

8.1.1.1 In ihrer Abundanz veränderte Proteine (Langzeitbehandlung)

8.1.2 Wurzeln

Tabelle 4: In ihrer Abundanz veränderte Proteine der Proteommessungen der Wurzeln langzeitbehandelter Reispflanzen

Pathway	Mapman Pathway	MSU ID	Durch chitt log2	Fold	uniprot oder http://pathway.gemene.org/	Vergleich mit anderen Studien	Vergleich mit anderen Studien	Vergleich mit anderen Studien	Vergleich mit anderen Studien	uniprot ID	Run 2	Run1	p-werte	RAP Id
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S14	LOCLOC_Os02g06700.1	-0.94	-1.92					Lu-jun Yu et al.	Q6H7T1_ORYSJ	0.81	-1.07	9.70E-13	Os02g0162500
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S15	LOC_Os07g08660.1	-0.79	-1.73					Lu-jun Yu et al.	Q0D852_ORYSJ	1.06	-0.52	1.65E-07	Os07g0184300
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S16	LOC_Os11g03400.1	-0.83	-1.78						RS16_ORYSJ	0.87	-0.78	2.59E-10	Os11g0127900
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S17	LOC_Os10g27190.1	-0.90	-1.86						Q7XEQ3_ORYSJ	0.96	-0.84	4.23E-15	Os10g0411800
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S18	LOC_Os03g58050.1	-0.69	-1.61					Lu-jun Yu et al.	Q8H588_ORYSJ	0.86	-0.52	1.06E-09	Os03g0794700
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S2	LOC_Os03g59310.1	-0.58	-1.49						Q84M35_ORYSJ	0.67	-0.48	2.46E-07	Os03g0807800
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S27	LOC_Os02g27769.1	-0.82	-1.77					Lu-jun Yu et al.	Q6K5R5_ORYSJ	0.88	-0.77	3.26E-13	Os02g0478700
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S28	LOC_Os10g27174.1	-0.81	-1.75						Q0IXR7_ORYSJ	0.50	-1.12	4.40E-08	Os10g0411700
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S3	LOC_Os03g38000.1	-0.64	-1.56					Lu-jun Yu et al.	Q75G91_ORYSJ	0.88	-0.41	2.00E-05	Os03g0577000
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S3A	LOC_Os12g21798.1	-0.72	-1.65					Lu-jun Yu et al.	Q0INR5_ORYSJ	0.77	-0.67	1.62E-10	Os12g0406200
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S6	LOC_Os07g42950.1	-0.65	-1.57					Lu-jun Yu et al.	Q8LH97_ORYSJ	0.74	-0.56	7.48E-09	Os07g0622100
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S8	LOC_Os04g28180.1	-0.75	-1.68					Lu-jun Yu et al.	Q0JDZ7_ORYSJ	0.89	-0.61	2.99E-11	Os04g0349500
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.SA	LOC_Os07g42450.1	-0.87	-1.82					Lu-jun Yu et al.	Q8H3I3_ORYSJ	0.83	-0.90	6.75E-14	Os07g0616600
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L13	LOC_Os03g37970.1	-0.74	-1.67					Lu-jun Yu et al.	Q7XJB4_ORYSJ	0.75	-0.74	1.95E-11	Os03g0576700
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L14	LOC_Os02g40880.1	-0.77	-1.70					Lu-jun Yu et al.	Q6K1Q6_ORYSJ	0.74	-0.79	3.34E-10	Os02g0622300
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L15	LOC_Os03g40180.1	-0.75	-1.68						Q8H8S1_ORYSJ	0.78	-0.72	8.04E-14	Os03g0598800
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L18	LOC_Os05g06310.1	-0.59	-1.51					Lu-jun Yu et al.	Q5WMY3_ORYSJ	0.76	-0.43	6.19E-08	Os05g0155100
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L22	LOC_Os07g47710.1	-0.64	-1.56						Q6YSX0_ORYSJ	0.78	-0.51	2.65E-09	Os07g0674200
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L27	LOC_Os10g41470.1	-0.73	-1.66						Q7XC31_ORYSJ	0.76	-0.71	3.46E-11	Os10g0564300
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L3	LOC_Os11g06750.1	-0.64	-1.56					Lu-jun Yu et al.	Q53JG0_ORYSJ	0.53	-0.74	2.50E-08	Os11g0168200
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L4/L1	LOC_Os07g08330.1	-0.75	-1.68					Lu-jun Yu et al.	Q0D868_ORYSJ	0.82	-0.69	2.20E-10	Os07g0180900
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L6	LOC_Os04g39700.1	-1.27	-2.41					Lu-jun Yu et al.	Q7XR19_ORYSJ	1.59	-0.94	1.04E-15	Os04g0473400
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L6	LOC_Os02g37862.1	-0.79	-1.73					Lu-jun Yu et al.	Q6YY64_ORYSJ	0.73	-0.85	6.80E-12	Os02g0591700
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L7	LOC_Os04g51630.1	-0.76	-1.69					Lu-jun Yu et al.	Q0JAC6_ORYSJ	0.89	-0.63	1.74E-11	Os04g0605900

ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L7A	LOC_Os09g32976.1	-0.52	-1.44		Lu-jun Yu et al.	Q0J0I3_ORYSJ	0.58	-0.46	2.90E-06	Os09g0507800		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L8	LOC_Os12g38000.1	-0.54	-1.45			Q2QNF3_ORYSJ	0.67	-0.41	1.44E-06	Os12g0567700		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.P0	LOC_Os08g03640.1	-0.72	-1.64		Lu-jun Yu et al.	Q0J878_ORYSJ	0.91	-0.52	1.84E-06	Os08g0130500		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.unknown organellar.50S subunit.L10A	LOC_Os02g21660.1	-0.88	-1.83		Lu-jun Yu et al.	Q6ER67_ORYSJ	0.95	-0.80	1.24E-14	Os02g0321900		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal RNA	LOC_Os08g09350.1	-0.90	-1.86		Lu-jun Yu et al.	NUCL1_ORYSJ	0.53	-1.27	5.61E-10	Os08g0192900		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S7	LOC_Os03g18570.1	-0.73	-1.66			Q10MS5_ORYSJ	0.88	-0.58	8.83E-11	Os03g0297100		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S9	LOC_Os03g05980.1	-0.62	-1.54			Q2R1J8_ORYSJ	0.76	-0.49	3.07E-08	Os03g0154700		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L12	LOC_Os04g50990.1	-0.74	-1.68			Q0JAI2_ORYSJ	0.79	-0.70	0.00012933	Os04g0598200		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L17	LOC_Os09g08430.1	-0.54	-1.46			Q6K1W6_ORYSJ	0.46	-0.62	1.87E-06	Os09g0258600		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L18	LOC_Os03g22180.1	-0.65	-1.57			Q10LN7_ORYSJ	0.43	-0.88	3.24E-05	Os03g0341100		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L18A	LOC_Os01g47660.1	-0.61	-1.53			Q0JKK9_ORYSJ	0.79	-0.44	4.93E-08	Os01g0666900		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L19	LOC_Os03g21940.1	-0.67	-1.59			Q10LR6_ORYSJ	0.79	-0.55	3.69E-12	Os03g0337800		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L21	LOC_Os03g04750.1	-0.75	-1.69			Q10RZ3_ORYSJ	0.76	-0.75	2.42E-11	Os03g0141000		
ribosomale Proteinsynthese	protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L22	LOC_Os03g22340.1	-0.64	-1.56			Q762A6_ORYSJ	0.44	-0.84	3.08E-07	Os03g0343500		
ribosomale Proteinsynthese	protein.eukaryotic.60S subunit.L35A	LOC_Os05g48310.1	-0.45	-1.37			Q6I608_ORYSJ	0.47	-0.44	5.62E-05	Os05g0556900		
ribosomale Proteinsynthese	protein.eukaryotic.40S subunit.S10	LOC_Os02g34460.2	-0.64	-1.56			Q6Z105_ORYSJ	0.64	-0.58	5.6853E-08	Os02g0549600		
Unbekannt	'not assigned.unknown'	LOC_Os09g32220.1	-0.47	-1.38			Q0J0J5_ORYSJ	0.47	-0.47	3.29E-06	Os09g0497400		
Unbekannt	not assigned.unknown major CHO metabolism.degradation.sucrose.Susy	LOC_Os07g45080.1	-1.05	-2.06		Chakraborty D et al.	Norton G. J. et al.	Q7EYL4_ORYSJ	1.27	-0.82	9.53E-12	Os07g0645300	
Unbekannt	misc.acid and other phosphatases	LOC_Os06g09450.1	-0.76	-1.69	udp-glycosyltransferase/ sucrose synthase/ transferase, transferring glycosyl groups (purple acid phosphatase 3); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase	Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	SUS2_ORYSJ	1.11	-0.41	2.24E-07	Os06g0194900	
Unbekannt	misc.alcohol dehydrogenases	LOC_Os08g01760.1	-1.00	-2.00	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein		Lu-jun Yu et al.	Q6ZC70_ORYSJ	1.21	-0.80	5.46E-11	Os08g0109200	
Unbekannt	misc.peroxidases	LOC_Os01g22370	-1.76	-3.38	peroxidase, putative		Huang TL et al.	Q9AS12_ORYSJ	1.54	-1.97	3.149E-26	Os01g0327400	
Unbekannt	misc.peroxidases	LOC_Os04g59150.1	-0.86	-1.82	peroxidase 12		Huang TL et al.	Q7XSV2_ORYSJ	0.76	-0.97	8.49E-14	Os04g0688100	
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os04g38390.1	-0.71	-1.63	lipid-associated family protein	Norton G. J. et al.	Huang TL et al.	Q7XRE7_ORYSJ	0.44	-0.97	1.38E-06	Os04g0456700	
Unbekannt	not assigned.unknown secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	LOC_Os02g41630.2	-1.23	-2.34	phenylalanine ammonia-lyase		Lu-jun Yu et al.	Q84R32_ORYSJ	0.70	-0.44	3.65E-07	Os03g0737000	
Unbekannt	not assigned.unknown amino acid metabolism.synthesis.glutamate family.proline hormone	LOC_Os07g48490.2	-2.49	-5.62	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	CAA64683 Ahsan N et al.		Lu-jun Yu et al.	Q6Z4N6_ORYSJ	2.79	-2.19	1.38E-44	Os07g0683900
Unbekannt	metabolism.brassinosteroid.signal	LOC_Os05g38150.1	-0.59	-1.51	citrulline biosynthesis			Q0DHN6_ORYSJ	0.61	-0.58	1.16E-07	Os05g0455500	
Unbekannt		LOC_Os08g21660.1	-0.53	-1.45	protein.synthesis.initiation' eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2, putative			Q6YS69_ORYSJ	0.56	-0.51	1.40E-06	Os08g0308100	

	transduction.other										
Unbekannt	misc.acyl transferases	LOC_Os01g43030.1	-0.66	-1.58	embryo defective 2753		Q5ZDJ3_ORYSJ	0.71	-0.62	9.84E-08	Os01g0617500
Unbekannt	misc.alcohol dehydrogenases	LOC_Os11g10510.1	-1.89	-3.70	alcohol dehydrogenase 1		ADH2_ORYSJ	2.03	-1.75	3.61E-52	Os11g0210500
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os08g02080.1	-1.56	-2.94	mitochondrial respiratory chain complex II		Q6ZCC4_ORYSJ	1.43	-1.68	4.89E-35	Os08g0112800
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os04g34100.1	-1.21	-2.31	mitochondrial respiratory chain complex II		Q0JDA2_ORYSJ	1.29	-1.13	2.01E-25	Os04g0418000
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os06g13810.1	-1.12	-2.18	pyrophosphate--fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase beta subuni		Q654U8_ORYSJ	1.23	-1.02	1.69E-22	Os06g0247500
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os01g70020.1	-0.49	-1.41	sequence idedential to q762a2 (bri1-kd interacting protein 112) coverage 55.1%		Q5JKH1_ORYSJ	0.46	-0.53	5.66E-07	Os01g0924900
Unbekannt	protein.aa activation.aspartate-tRNA ligase	LOC_Os02g46130.1	-0.63	-1.55	aspartate--tRNA ligase, putative		Q6ZHC3_ORYSJ	0.44	-0.82	1.38E-05	Os02g0686400
Unbekannt	protein.targeting.secretory pathway.unspecified TCA / org. transformation.TCA.succinate dehydrogenase	LOC_Os01g66560.1	-0.91	-1.88	7s RNA binding		Q5N842_ORYSJ	0.71	-1.11	9.44E-10	Os01g0889000
Unbekannt	protein.degradation.aspartate protease	LOC_Os07g04240.1	-0.49	-1.40	flavoprotein subunit of complex ii succinate dehydrogenase		DHSA_ORYSJ	0.55	-0.42	2.09E-05	Os07g0134800
Proteolyse / Synthese	protein.degradation.aspartate protease	LOC_Os05g49200.1	-1.50	-2.83	lipid metabolic process		Lu-jun Yu et al. Q0DFW1_ORYSJ	1.50	-1.50	2.77E-36	Os05g0567100
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.elongation	LOC_Os07g46750.1	-0.90	-1.87	aspartic proteinase oryzasin-1 precursor		Lu-jun Yu et al. Q0D3W6_ORYSJ	0.80	-1.01	2.55E-11	Os07g0662500
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.elongation	LOC_Os07g42300.1	-0.78	-1.72	elongation factor 1-delta 1		Lu-jun Yu et al. Q0D4P5_ORYSJ	0.84	-0.73	2.78E-07	Os07g0614500
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.elongation	LOC_Os02g32030.1	-0.68	-1.60	elongation factor 2		Lu-jun Yu et al. Q6H4L2_ORYSJ	0.87	-0.49	2.21E-07	Os02g0519900
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.elongation	LOC_Os01g71230.1	-1.00	-1.99	nac transcription factor	NP_914976 Ahsan N et al.	Lu-jun Yu et al. Q8RUI4_ORYSJ	0.96	-1.03	1.42E-17	Os01g0938900
Proteolyse / Synthese	protein.degradation.metalloprotease	LOC_Os05g28280.1	-1.16	-2.24	aminopeptidase/ metalloexopeptidase		Q5W6H1_ORYSJ	1.37	-0.95	5.89E-14	Os05g0350500
Proteolyse / Synthese	protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin	LOC_Os05g06770.1	-0.43	-1.35	ubq5 (ubiquitin 5)		B7F573_ORYSJ	0.46	-0.40	0.00010298	Os05g0160200
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.elongation	LOC_Os03g08010.1	-0.76	-1.70	elongation factor 1-alpha / ef-1-alpha		EF1A_ORYSJ	0.95	-0.58	1.13E-09	Os03g0177400
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.initiation	LOC_Os03g18510.1	-0.71	-1.63	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1, putative		Q10MT2_ORYSJ	0.85	-0.56	8.29E-14	Os03g0296400
Proteolyse / Synthese	protein.synthesis.initiation	LOC_Os03g55150.1	-0.74	-1.67	eukaryotic elongation factor 5a-3		Q9AUW3_ORYSJ	0.77	-0.71	2.00E-09	Os03g0758800
RNA Regulation	RNA.regulation of transcription.Chromatin Remodeling Factors	LOC_Os07g08880.1	-0.56	-1.47	phd-41 zincfinger		Q0D838_ORYSJ	0.47	-0.65	8.92E-07	Os07g0186400
RNA Regulation	RNA.processing	LOC_Os09g02700.1	-1.22	-2.32	poly(a) binding protein 8		Lu-jun Yu et al. Q6YV11_ORYSJ	1.27	-1.16	1.19E-25	Os09g0115400
RNA Regulation	RNA.regulation of transcription.HDA RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	LOC_Os05g51830.1	-0.60	-1.51	histone deacetylase 2b		Lu-jun Yu et al. Q0DFD6_ORYSJ	0.64	-0.55	1.03E-07	Os05g0597100
RNA Regulation	RNA.RNA binding	LOC_Os03g52490.1	-0.94	-1.92	putative uncharacterized protein		Lu-jun Yu et al. Q6AVS5_ORYSJ	0.71	-1.18	1.86E-11	Os03g0735300
RNA Regulation	RNA.RNA binding	LOC_Os03g46770.1	-1.31	-2.48	cold, circadian rhythm, and RNA binding 2		Q6ASX7_ORYSJ	0.86	-1.76	8.41E-17	Os03g0670700
RNA Regulation	RNA.regulation of transcription.Argonaute	LOC_Os12g43600.1	-1.05	-2.07	ccr2 (cold, circadian rhythm, and RNA binding 2)		Q2QLR2_ORYSJ	1.08	-1.03	4.50E-20	Os12g0632000
RNA Regulation	RNA.regulation of transcription.Argonaute	LOC_Os01g16870.1	-1.00	-1.99	ago4 (argonaute 4)		AGO4A_ORYSJ	0.95	-1.04	1.44E-17	Os01g0275600
RNA Regulation	RNA.regulation of transcription.Argonaute	LOC_Os04g06770.1	-0.67	-1.61	ago4 (argonaute 4)		AGO4B_ORYSJ	0.58	-0.79	3.69E-06	Os04g0151800
Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LOC_Os07g37240.1	-1.46	-2.74			Lu-jun Yu et al. Q6Z411_ORYSJ	0.74	-2.17	8.82E-10	Os07g0558400
Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LOC_Os03g39610.1	-0.82	-1.77			Lu-jun Yu et al. CB23_ORYSJ	0.79	-0.85	1.16E-12	Os03g0592500

Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os10g38229.1	-1.21	-2.31			PSAA_ORYSJ	0.72	-1.69	6.11E-09	
Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os04g16770.1	-2.19	-4.55			PSBA_ORYSJ	1.82	-2.56	1.15E-30	
Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os10g21212.1	-1.65	-3.13			PSBC_ORYSJ	1.72	-1.57	3.76E-42	
Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os10g21310.1	-1.65	-3.13			PSBB_ORYSJ	1.52	-1.77	6.92E-40	
Lichtreaktion	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os01g64960.1	-0.99	-1.98			Q943K1_ORYSJ	0.67	-1.30	4.97E-11	Os01g0869800
Zellorganisation	cell.organisation	LOC_Os02g51750.1	-1.18	-2.27	annexin <i>arabidopsis</i> 7	Huang TL et al.	Q6Z6A7_ORYSJ	1.28	-1.09	6.92E-30	Os02g0753800
Zellorganisation	cell.organisation	LOC_Os07g38730.1	-0.64	-1.56	tubulin structural constituent of cytoskeleton		Q0PVB0_ORYSJ	0.73	-0.56	1.01E-08	Os07g0574800
Zellorganisation	cell.organisation	LOC_Os06g46000.1	-0.58	-1.49	tubulin structural constituent of cytoskeleton		TBB3_ORYSJ	0.57	-0.59	3.71E-07	Os06g0671900
Zellorganisation	cell.organisation	LOC_Os03g11970.1	-1.37	-2.58	tubulin structural constituent of cytoskeleton		Q10PW2_ORYSJ	1.57	-1.16	3.81E-18	Os03g0219300
Zellorganisation	cell.organisation	LOC_Os08g04280.1	-0.73	-1.65	actin structural constituent of cytoskeleton		ARP4_ORYSJ	0.45	-1.00	6.98E-07	Os08g0137200
Zellorganisation	development.unspecified	LOC_Os01g51300.1	-0.99	-1.99	histone-binding protein five; metal ion binding wd40 protein		Q5NAI9_ORYSJ	0.92	-1.06	1.95E-17	Os01g0710000
Zellorganisation	development.unspecified	LOC_Os01g07780.1	-0.81	-1.76	os01g0172800 protein		Q94E65_ORYSJ	0.59	-1.03	3.72E-08	Os01g0172800
Gluconeogenese/Glykolyse	gluconeogenese/ glyoxylate cycle.PEPCK	LOC_Os03g15050.1	-1.40	-2.64	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1		Q10NX2_ORYSJ	1.09	-1.72	5.60E-19	Os03g0255500
Gluconeogenese e/Glykolyse	glycolysis.cytosolic branch.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)	LOC_Os08g03290	-0.77	-1.71	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase c subunit 1	XP_479895 Ahsan N et al.	G3PC1_ORYSJ	0.78	-0.76	9.00E-12	Os08g0126300
Gluconeogenese e/Glykolyse	gluconeogenese/ glyoxylate cycle.pyruvate dikinase	LOC_Os03g31750.1	-3.34	10.14	pyruvate orthophosphate dikinase		PPDK2_ORYSJ	3.01	-3.67	7.65E-59	Os03g0432100
Gluconeogenese e/Glykolyse	glycolysis.plastid branch.phosphofruktokinase (PFK)	LOC_Os05g44922.1	-0.79	-1.73	6-phosphofruktokinase		Q65X97_ORYSJ	0.67	-0.90	8.30E-12	Os05g0524400
Gluconeogenese e/Glykolyse	misc.gluco-, galacto- and mannosidases.alpha-galactosidase	LOC_Os06g46284.1	-0.96	-1.95	alpha-glucosidase 1		AGLU_ORYSJ	0.56	-1.36	5.58E-11	Os06g0675700
Gluconeogenese e/Glykolyse	OPP.oxidative PP.G6PD	LOC_Os04g40874.1	-0.74	-1.67	glucose-6-phosphate dehydrogenase 6		Q7X7I6_ORYSJ	0.56	-0.92	3.76E-07	Os04g0485300
Transport	transport.amino acids	LOC_Os02g55890.1	-1.69	-3.22	ATPase/ hydrogen-translocating pyrophosphatase		Q75U53_ORYSJ	2.26	-1.11	1.10E-14	Os02g0802500
Transport	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	LOC_Os04g44060.1	-1.02	-2.03	pip2b (plasma membrane intrinsic protein 2)	Huang TL et al.	PIP23_ORYSJ	0.41	-1.64	2.81E-07	Os04g0521100
Transport	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	LOC_Os02g57720.1	-0.99	-1.99	pip1;5 (plasma membrane intrinsic protein 1;5)	Huang TL et al.	PIP13_ORYSJ	0.87	-1.12	2.93E-12	Os02g0823100
Transport	transport.p- and v-ATPases mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	LOC_Os04g56160.1	-0.98	-1.97	aha2; ATPase/ hydrogen-exporting ATPase, phosphorylative mechanism	Huang TL et al.	Q0J9F5_ORYSJ	1.19	-0.77	1.40E-10	Os04g0656100
Transport	ATP synthase.f1 sector subunit beta	LOC_Os06g39740.1	-1.78	-3.43			ATPB_ORYSJ	1.29	-2.27	1.60E-24	
Calvin-Zyklus	PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os01g67860.1	-1.56	-2.96	fructose-bisphosphate aldolase		Q5N725_ORYSJ	1.79	-1.33	1.76E-33	Os01g0905800
Calvin-Zyklus	PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os08g02700.1	-0.79	-1.73	fructose-bisphosphate aldolase, putative		Q6YPF1_ORYSJ	0.93	-0.65	2.93E-12	Os08g0120600
Calvin-Zyklus	PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os01g02880.1	-0.68	-1.60	fructose-bisphosphate aldolase, putative		Q94JJ0_ORYSJ	0.43	-0.92	1.71E-05	Os01g0118000
Calvin-Zyklus	PS.calvin cycle.rubisco small subunit	LOC_Os12g19381.1	-2.18	-4.54	ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1a		Q2QTJ7_ORYSJ	2.29	-2.08	1.16E-64	Os12g0291400
Calvin-Zyklus	PS.calvin cycle.rubisco large subunit	LOC_Os12g10580.1	-2.26	-4.80	large subunit of rubisco		RBL_ORYSJ	2.34	-2.19	5.46E-68	Os12g0207600
DNA-Synthese	DNA.synthesis/chromatin structure	LOC_Os07g44190.1	-1.21	-2.31	pseudouridine synthase	Norton G. J. et al.	Q8H5T5_ORYSJ	0.78	-1.63	4.67E-15	Os07g0636000
DNA-Synthese	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	LOC_Os03g58470.1	-0.85	-1.81	histone h1		Q851P9_ORYSJ	0.65	-1.06	8.42E-09	Os03g0799000
DNA-Synthese	DNA.synthesis/chromatin structure.histone	LOC_Os05g38640.1	-0.49	-1.41	h2a.4		H2A4_ORYSJ	0.42	-0.57	1.43E-05	Os05g0461400

Stress	stress.abiotic.cold	LOC_Os08g03520.1	-0.99	-1.99	regulation of transcription, DNA-dependent			Q84UR8_ORYSJ	0.75	-1.23	3.80E-11	Os08g0129200		
Stress	stress.abiotic.cold	LOC_Os02g02870.1	-0.96	-1.94	cold shock domain protein 1			Q6YUR8_ORYSJ	0.58	-1.33	2.43E-09	Os02g0121100		
Stress	stress.biotic	LOC_Os04g58850.1	-1.47	-2.77	harpin-induced protein 1		Lu-jun Yu et al.	Q7XPU1_ORYSJ	1.40	-1.54	1.96E-33	Os04g0685300		
Unbekannt	'not assigned.unknown'	LOC_Os01g72430.1	0.91	1.87	NADPH:quinone oxidoreductase 1			Q0JFY5_ORYSJ	-1.38	0.43	5.57E-06	Os01g0953600		
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os03g63860.1	0.94	1.92	dana2, putative hydrolase, acting on ester bonds / methyl indole-3-acetate esterase/ methyl jasmonate esterase/ methyl salicylate esterase	Chakraborty D et al.		OEP24_ORYSJ	-0.82	1.06	1.74E-16	Os03g0855600		
Unbekannt	misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes, reticuline oxidases, troponine reductases nucleotide	LOC_Os01g70850.1	5.00	32.01			Lu-jun Yu et al.	PIR7B_ORYSJ	-5.89	4.11	2.40E-08	Os01g0934800		
Unbekannt	metabolism.salvage.nucleoside kinases.adenosine kinase	LOC_Os02g41590.1	0.89	1.85	adenosine kinase 2		Lu-jun Yu et al.	Q0DZE5_ORYSJ	-0.43	1.35	7.29E-07	Os02g0625500		
Unbekannt	misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	LOC_Os02g10880.1	1.40	2.63	indole-3-acetate beta-d-glucosyltransferase		Lu-jun Yu et al.	Q0E2Y7_ORYSJ	-1.41	1.39	8.05E-31	Os02g0203300		
Unbekannt	RNA.processing.splicing	LOC_Os02g05410.1	0.65	1.57	splicing factor 3b subunit 1			Q0E3Z1_ORYSJ	-0.67	0.63	3.90E-07	Os02g0147300		
Unbekannt	signalling.G-proteins	LOC_Os01g37800.1	0.80	1.74	arabidopsis ras 5			Q0JLX8_ORYSJ	-0.46	1.14	1.16E-07	Os01g0558600		
Unbekannt	RNA.RNA binding	LOC_Os01g16090.1	0.78	1.72	ubp1 interacting protein 2a		Lu-jun Yu et al.	Q0JNU2_ORYSJ	-0.44	1.13	2.09E-07	Os01g0265800		
Unbekannt	signalling.receptor kinases.misc	LOC_Os03g16950.1	1.01	2.01	33 kda secretory protein-related			Q10N98_ORYSJ	-1.59	0.43	3.62E-07	Os03g0277600		
Unbekannt	development.unspecified	LOC_Os01g59740.1	1.08	2.11	regulation of transcription, DNA-dependent			Q5VQR0_ORYSJ	-0.69	1.47	4.09E-09	Os01g0812900		
Unbekannt	RNA.processing.splicing	LOC_Os05g07050.1	0.63	1.55	pre-mRNA-processing-splicing factor 8			Q5WAB4_ORYSJ	-0.57	0.69	2.06E-08	Os05g0163200		
Unbekannt	signalling.G-proteins	LOC_Os03g59590.1	0.66	1.59	miro-related GTP-ase 1			Q6ATR5_ORYSJ	-0.65	0.68	3.38E-09	Os03g0810600		
Unbekannt	misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes, reticuline oxidases, troponine reductases	LOC_Os09g04730.1	0.87	1.82	indole-3-butyric acid response 1			Q6K447_ORYSJ	-0.91	0.82	7.78E-14	Os09g0133200		
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os05g51420.1	1.90	3.74	band 7 family protein			Q6L4S3_ORYSJ	-1.78	2.03	9.46E-53	Os05g0591900		
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os08g06200.1	1.12	2.17	mitochondria channel formation		Norton G. J. et al.	Q7EZD2_ORYSJ	-1.02	1.21	3.21E-22	Os08g0158500		
Unbekannt	Co-factor and vitamine metabolism	LOC_Os04g42000.1	0.83	1.78	flavin biosynthesis			Q7XUK6_ORYSJ	-0.43	1.23	3.53E-06	Os04g0497400		
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os07g44410.1	2.38	5.22	tolb protein-related wd40-like beta propeller repeat family protein	Chakraborty D et al.	Norton G. J. et al.	Lu-jun Yu et al.	Q8GVH2_ORYSJ	-2.60	2.17	8.30E-21	Os07g0638100	
Unbekannt	not assigned.unknown	LOC_Os10g32700.1	2.26	4.79	band 7 family protein	Chakraborty D et al.		Q8H918_ORYSJ	-2.40	2.12	2.11E-63	Os10g0464000		
Unbekannt			3.95	7.72	putative sex determination protein tasselseed 2			Q8LID2_ORYSJ	-2.71	3.19	5.9049E-41			
Unbekannt	misc.short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	LOC_Os10g31780.1	2.74	6.68	fatty acid biosynthesis		sucrose degradation to ethanol and lactate (anaerobic)	Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q7XDQ8_ORYSJ	-2.60	2.88	4.19E-88	Os10g0456100
Unbekannt	protein.targeting.nucleus amino acid	LOC_Os12g38110.1	0.59	1.51	importin beta-2			Q9ZWR4_ORYSJ	-0.57	0.61	1.30E-07	Os12g0568800		
Aminosäuren-Stoffwechsel	metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.cysteine.OASTL	LOC_Os12g42980.1	2.37	5.17	cysteine biosynthesis i	Q9XEA6 Ahsan N et al.		CYSK1_ORYSJ	-2.92	1.83	6.68E-18	Os12g0625000		

Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.cysteine.OASTL amino acid	LOC_Os03g53650.1	2.11	4.32	cysteine biosynthesis i	Q9XEA6 Ahsan N et al. CAC82203 Ahsan N et al. CAC82203 Ahsan N et al.	CYSK2_ORYSJ	-1.45	2.77	9.53E-20	Os03g0747800		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine	LOC_Os05g04510.1	0.92	1.89	ethylene s-adenosylmethionine synthetase 1		METK1_ORYSJ	-0.49	1.34	3.44E-07	Os05g0135700		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine amino acid	LOC_Os01g22010.1	1.49	2.81	ethylen s-adenosylmethionine synthetase 2		METK2_ORYSJ	-0.90	2.08	4.78E-13	Os01g0323600		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.alanine aminotransferase	LOC_Os07g42600.1	0.93	1.90	alanine:2-oxoglutarate aminotransferase		Q0D4M5_ORYSJ	-0.71	1.15	1.13E-09	Os07g0617800		
Aminosäuren-Stoffwechsel	C1-metabolism.glycine hydroxymethyltransferase	LOC_Os12g22030.1	1.02	2.03	serine hydroxymethyltransferase 4		Q0INQ6_ORYSJ	-0.67	1.37	2.55E-11	Os12g0409000		
Aminosäuren-Stoffwechsel	C1-metabolism.glycine hydroxymethyltransferase amino acid	LOC_Os11g26860.1	1.21	2.32	serine hydroxymethyltransferase 4		Q0ISV6_ORYSJ	-0.78	1.65	6.30E-11	Os11g0455800		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.tyrosine.rogenate dehydrogenase 1& prephenate dehydrogenase	LOC_Os06g49505.1	0.83	1.77	prephenate dehydrogenase family protein		Q5Z9H5_ORYSJ	-0.91	0.74	7.71E-13	Os06g0708832		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.degradation.branched-chain group.valine amino acid	LOC_Os07g09060.1	1.63	3.10	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating)/ oxidoreductase		Q6Z4E4_ORYSJ	-1.44	1.83	5.68E-48	Os07g0188800		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.tryptophan.tryptophan synthase	LOC_Os07g08430.1	2.56	5.89	tryptophan biosynthesis	Norton G. J. et al.	Q6ZL61_ORYSJ	-2.51	2.60	1.94E-80	Os07g0182100		
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.serine.phosphoglycerate dehydrogenase	LOC_Os04g55720.1	1.37	2.59	serine synthase	Norton G. J. et al.	Lu-jun Yu et al.	Q7XMP6_ORYSJ	-0.90	1.85	4.48E-13	Os04g0650800	
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.degradation.branched-chain group.shared amino acid	LOC_Os02g57260.1	1.04	2.06	peroxisomal 3-ketoacyl-coa thiolase 3		Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q84P96_ORYSJ	-1.05	1.04	5.08E-19	Os02g0817700
Aminosäuren-Stoffwechsel	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.serine.phosphoserine aminotransferase	LOC_Os03g06200.1	2.39	5.24	o-phospho-l-serine:2-oxoglutarate aminotransferase		Lu-jun Yu et al.	Lu-jun Yu et al.	Q8LMR0_ORYSJ	-1.85	2.92	5.19E-23	Os03g0157900
Kohlenstoff-Stoffwechsel	C1-metabolism major CHO	LOC_Os06g29180.1	2.44	5.41	formate dehydrogenase		Lu-jun Yu et al.	Q0DC43_ORYSJ	-2.08	2.79	1.76E-44	Os06g0486800	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	metabolism.degradation.sucrose.hex okinase	LOC_Os05g44760.1	0.93	1.91	hexokinase 1		Huang TL et al.	Q0DGM7_ORYSJ	-0.94	0.93	1.02E-15	Os05g0522500	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	gluconeogenese/ glyoxylate cycle.citrate synthase	LOC_Os02g13840.1	1.19	2.29	citrate synthase 3		Huang TL et al.	Q0E2K1_ORYSJ	-1.14	1.24	6.65E-25	Os02g0232400	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	fermentation.LDH TCA / org.	LOC_Os02g01510.1	0.55	1.47	l-lactate dehydrogenase		Huang TL et al.	Q0E4Q5_ORYSJ	-0.44	0.67	7.60E-07	Os02g0105400	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	transformation.TCA.pyruvate DH.E1 major CHO	LOC_Os09g33500.1	0.92	1.89	pyruvate dehydrogenase			Q0J0H4_ORYSJ	-0.55	1.29	3.30E-07	Os09g0509200	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	metabolism.degradation.sucrose.hex okinase	LOC_Os01g53930.1	0.44	1.35	hexokinase 1			Q0JF0_ORYSJ	-0.45	0.42	0.00013099	Os01g0742500	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	misc.beta 1,3 glucan hydrolases.glucan endo-1,3-beta-glucosidase	LOC_Os01g71830.1	0.98	1.97	cellulose biosynthesis	xp_463703 Ahsan N et al.		Q5JMU8_ORYSJ	-1.24	0.71	7.11E-11	Os01g0946700	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	OPP.oxidative PP.6-phosphogluconate dehydrogenase	LOC_Os06g02144.1	1.28	2.43	pentose phosphate pathway (oxidative branch)		Lu-jun Yu et al.	Q5VS01_ORYSJ	-0.82	1.74	8.87E-12	Os06g0111500	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	fermentation.LDH	LOC_Os09g26880.1	1.25	2.38	aldehyde dehydrogenase 7b4		Huang TL et al.	Q69P84_ORYSJ	-1.04	1.46	2.37E-17	Os09g0440300	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	PS.calvin cycle.phosphoglycerate kinase	LOC_Os02g07260.1	1.31	2.48	sucrose degradation to ethanol and lactate (anaerobic)	glycolysis I, gluconeogenesis		Q6H6C7_ORYSJ	-1.08	1.55	1.32E-10	Os02g0169300	
Kohlenstoff-Stoffwechsel	TCA / org. transformation.TCA.CS	LOC_Os02g10070.1	0.59	1.51	ATP citrate synthase			Q7F8R1_ORYSJ	-0.45	0.73	2.51E-07	Os02g0194100	

Kohlenstoff-Stoffwechsel	major CHO metabolism, sucrose degradation, sucrose fructokinase	LOC_Os01g66940.1	1.16	2.23	sucrose degradation i, sucrose degradation to ethanol and lactate (anaerobic), sucrose degradation iii				SCRK1_ORYSJ	-0.84	1.47	7.89E-14	Os01g0894300		
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os10g38740.1	4.86	28.98	glutathione-toxin conjugate tau GST	NP_922482 Ahsan N et al.			Huang TL et al. Lu-jun Yu et al.	GSTU6_ORYSJ	-4.12	5.59	6.02E-28	Os10g0530900	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os03g17480.1	3.97	15.71	GST_lambda protein n2-1 protein	omega	Chakraborty D et al.			IN21A_ORYSJ	-3.07	4.87	0.00030999	Os03g0283200	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os01g55830.1	1.87	3.66	glutathione s-transferase GSTf2				Huang TL et al.	Q0JJ25_ORYSJ	-1.49	2.26	1.75E-20	Os01g0764000	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os03g50130.1	3.90	14.93	microsomal glutathione s-transferase, putative	AAQ02686 Ahsan N et al.			Huang TL et al. Lu-jun Yu et al.	Q10E40_ORYSJ	-3.61	4.19	1.02E-76	Os03g0709000	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os01g27210.1	3.93	15.28	GST class-phi				Huang TL et al.	Q5ZC86_ORYSJ	-3.67	4.20	2.17E-77	Os01g0369700	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os02g21460.1	2.62	6.13	glutathione s-transferase					Q6EQX0_ORYSJ	-2.01	3.22	1.39E-25	Os02g0319300	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os10g38189.1	3.34	10.16	GST_tau		Chakraborty D et al.	Norton G. J. et al.	Huang TL et al.	Q6QN18_ORYSJ	-2.64	4.04	1.572E-20	Os10g0525800	
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os10g38780.1	2.95	7.74	GST_tau			Norton G. J. et al.		Lu-jun Yu et al.	Q8L4V6_ORYSJ	-2.55	3.35	2.51E-36	Os10g0531400
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os10g38340.1	3.71	13.13	GST_tau				Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q8RUJ2_ORYSJ	-4.72	2.71	1.36E-04	Os10g0527400
Glutathion-S-Transferasen		LOC_Os01g72130.1	2.81	7.00	putative glutathione s-transferase					Lu-jun Yu et al.	Q8RZB3_ORYSJ	-2.56	3.05	1.8935E-88	Os01g0949850
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os10g38360.1	2.92	7.59	GST_tau			Norton G. J. et al.	Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q945W6_ORYSJ	-3.25	2.60	2.2689E-50	Os10g0527800
Glutathion-S-Transferasen	misc.glutathione S transferases	LOC_Os10g38489.1	3.88	14.75	GST_tau			Norton G. J. et al.	Huang TL et al.		Q9FUE3_ORYSJ	-3.16	4.60	1.77E-24	Os10g0528400
Stress	stress.biotic	LOC_Os05g33130.1	2.05	4.14	cell wall macromolecule catabolic process chitinase				Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	CHI2_ORYSJ	-2.25	1.85	2.40E-32	Os05g0399300
Stress	stress.abiotic.heat	LOC_Os08g39140.1	1.60	3.03	heat shock protein 81-2				Huang TL et al.		HSP81_ORYSJ	-1.31	1.90	2.24E-23	Os08g0500700
Stress	not assigned.unknown	LOC_Os12g36850.1	1.71	3.28	pathogenesis-related bet v						Q2QNT0_ORYSJ	-1.48	1.95	5.83E-26	Os12g0555200
Stress	stress.biotic	LOC_Os05g15770.1	0.97	1.97	class iii chitinase homolog h			Norton G. J. et al.	Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q5WMX0_ORYSJ	-1.26	0.69	1.90E-11	Os05g0247100
Stress	not assigned.unknown	LOC_Os07g41820.1	2.12	4.36	stress responsive a/b barrel						Q6YTX5_ORYSJ	-1.78	2.47	1.57E-26	Os07g0609000
Stress	not assigned.unknown	LOC_Os08g05960.1	3.80	13.97	pathogen					Lu-jun Yu et al.	Q6ZDA6_ORYSJ	-3.64	3.96	1.45E-129	Os08g0155900
Stress	not assigned.unknown	LOC_Os12g36830.1	1.34	2.54	pathogenesis-related bet v						Q75T45_ORYSJ	-0.72	1.97	1.03E-10	Os12g0555000
Stress	not assigned.unknown	LOC_Os04g10240.1	0.64	1.56	lesion inducing protein-relate						Q7XSC5_ORYSJ	-0.78	0.50	1.79E-08	Os04g0181100
Stress	stress.biotic	LOC_Os10g11500	1.26	2.40	pathogenesis-related gene 1						Q8LMW8_ORYSJ	-1.30	1.23	3.89E-26	Os10g0191300
Stress	misc.myrosinases-lectin-jacalin	LOC_Os01g24710.1	1.38	2.61	salt stress-induced protein	Np_908901 Ahsan N et al.				Lu-jun Yu et al.	SALT_ORYSJ	-2.21	0.56	5.92E-10	Os01g0348900
Redoxstoffwechsel	protein.targeting.peroxisomes	LOC_Os06g03660.1	0.86	1.82	cell.organisation' peroxisomal biogenesis factor 11						PX115_ORYSJ	-0.87	0.85	8.65E-14	Os06g0127000
Redoxstoffwechsel	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	LOC_Os07g49400.1	1.00	2.01	ascorbate peroxidase 1				Huang TL et al.		Q0D3B8_ORYSJ	-1.01	0.99	8.22E-18	Os07g0694700
Redoxstoffwechsel	misc.cytochrome P450	LOC_Os03g55240.1	1.92	3.79	cyp81d5; electron carrier/ heme binding		Chakraborty D et al.	Norton G. J. et al.	Huang TL et al.		Q0DND2_ORYSJ	-0.76	3.09	7.23E-13	Os03g0760200
Redoxstoffwechsel	misc.oxidases - copper, flavone etc.	LOC_Os08g02230.1	2.08	4.24	flavin adenine dinucleotide binding						Q6YXT5_ORYSJ	-1.18	2.99	5.07E-05	Os08g0114300
Redoxstoffwechsel	misc.peroxidases	LOC_Os05g06970.1	0.99	1.99	betanidin degradation		Chakraborty D et al.	Norton G. J. et al.	Huang TL et al.		Q75IS1_ORYSJ	-0.75	1.24	1.20E-08	Os05g0162000
Redoxstoffwechsel	misc.cytochrome P450	LOC_Os07g44140.1	2.27	4.83	cytochrome p450 72a1				Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q8LIR5_ORYSJ	-1.78	2.77	1.08E-35	Os07g0635500
Redoxstoffwechsel	redox.peroxiredoxin	LOC_Os07g44440.1	3.27	9.64	thioredoxin peroxidase				Huang TL et al.		REHYB_ORYSJ	-3.23	3.30	1.67E-109	Os07g0638400

Redoxstoffwechsel	redox.thioredoxin	LOC_Os07g08840.1	3.09	8.53	ros			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	TRXH1_ORYSJ	-3.09	3.09	1.84E-102	Os07g0186000
Sekundärstoffwechsel	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	LOC_Os09g23530.1	0.96	1.94	probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 8a					CAD8A_ORYSJ	-0.61	1.30	1.88E-09	Os09g0399800
Sekundärstoffwechsel	secondary metabolism.simple phenols	LOC_Os12g15680.1	4.37	20.63	lignin laccase 7	Chakrabarty D et al.			Lu-jun Yu et al.	LAC24_ORYSJ	-3.84	4.89	4.85E-54	Os12g0258700
Sekundärstoffwechsel	misc.O-methyl transferases	LOC_Os08g06100.1	0.85	1.81	caffeate o-methyltransferase/ myricetin 3-o-methyltransferase				Lu-jun Yu et al.	OMT1_ORYSJ	-0.52	1.19	7.04E-08	Os08g0157500
Sekundärstoffwechsel	secondary metabolism.phenylpropanoids	LOC_Os11g31090.1	1.67	3.19	anthranilate n-benzoyltransferase protein 2					Q0ISK0_ORYSJ	-1.18	2.16	1.49E-17	Os11g0507200
Sekundärstoffwechsel	secondary metabolism.isoprenoids.mevalonate pathway.acetyl-CoA C-acyltransferase	LOC_Os09g07830.1	0.78	1.72	acetoacetyl-coa thiolase 2					Q0J366_ORYSJ	-0.45	1.11	1.43E-07	Os09g0252100
Sekundärstoffwechsel	misc.alcohol dehydrogenases	LOC_Os01g34480.1	2.07	4.18	lignin cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative		Norton G. J. et al.	Huang TL et al.		Q5QM39_ORYSJ	-1.77	2.36	5.9191E-34	Os01g0528800
Sekundärstoffwechsel	secondary metabolism.phenylpropanoids	LOC_Os07g04970.1	2.39	5.25	n-hydroxycinnamoyl benzoyltransferase-like protein	Chakrabarty D et al.	Norton G. J. et al.			Q8H4K0_ORYSJ	-3.27	1.51	1.95E-13	Os07g0142700
Sekundärstoffwechsel	not assigned.unknown	LOC_Os01g16146.1	1.98	3.95	phenazine biosynthesis protein		Norton G. J. et al.		Lu-jun Yu et al.	Q9SDD7_ORYSJ	-1.53	2.44	3.42E-22	Os01g0266500
Hormonstoffwechsel	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.12-Oxo-PDA-reductase	LOC_Os06g11290.1	2.14	4.40	jasmonic acid biosynthesis opr1; 12-oxophytodienoate reductase	Bad35829 Ahsan N et al.		Huang TL et al.		OPR1_ORYSJ	-1.10	3.17	3.61E-05	Os06g0216300
Hormonstoffwechsel	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.12-Oxo-PDA-reductase	LOC_Os06g11210.1	4.34	20.28	jasmonic acid biosynthesis opr1; 12-oxophytodienoate reductase	cad89604 Ahsan N et al.			Lu-jun Yu et al.	OPR5_ORYSJ	-3.05	5.63	0.00014685	Os06g0215600
Hormonstoffwechsel	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.lipoxygenase	LOC_Os03g49380.1	1.41	2.66	lox5; electron carrier/ iron ion binding / lipoxygenase			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q0DPC9_ORYSJ	-1.24	1.58	7.57E-33	Os03g0700700
Hormonstoffwechsel	Biodegradation of Xenobiotics	LOC_Os08g37060.1	0.62	1.54	gibberellin receptor gid1					Q6ZDG3_ORYSJ	-0.63	0.62	5.45E-08	Os08g0475400
Hormonstoffwechsel	cell wall.precursor synthesis.UGE	LOC_Os05g51670.1	1.21	2.31	brassinosteroid biosynthesis II			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q8LNZ3_ORYSJ	-0.84	1.57	7.63E-11	Os05g0595100
Hormonstoffwechsel	misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	LOC_Os01g53350.1	3.31	9.90	cytokinins-o-glucoside biosynthesis		Norton G. J. et al.			Q942C4_ORYSJ	-2.76	3.86	6.31E-33	Os01g0734800
Hormonstoffwechsel	misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	LOC_Os03g55050.1	3.19	9.13	cytokinins-o-glucoside biosynthesis	Chakrabarty D et al.	Norton G. J. et al.			Q9AUV4_ORYSJ	-3.29	3.09	6.36E-98	Os03g0757600
Fettstoffwechsel	lipid metabolism.lipid degradation.beta-oxidation.multifunctional gluconeogenesis/ glyoxylate cycle.pyruvate dikinase	LOC_Os10g42299.1	2.26	4.78	carnitine/acylcarnitine transLOCase					A3C7K0_ORYSJ	-1.79	2.72	2.6983E-26	Os10g0573800
Fettstoffwechsel	lipid metabolism.lipid degradation.beta-oxidation.multifunctional gluconeogenesis/ glyoxylate cycle.pyruvate dikinase	LOC_Os02g17390.1	0.82	1.76	peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	MFP_ORYSJ	-0.65	0.98	5.40E-13	Os02g0274100
Fettstoffwechsel	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl coa ligase	LOC_Os05g33570.1	0.98	1.97	lipid biosynthetic process pyruvate orthophosphate dikinase					PPDK1_ORYSJ	-0.58	1.37	7.69E-08	Os05g0405000
Fettstoffwechsel	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl coa ligase	LOC_Os03g19250.1	0.77	1.70	(acyl-activating enzyme 7); amp binding / acetate-coa ligase					Q10MK9_ORYSJ	-0.69	0.84	4.02E-11	Os03g0305100
Fettstoffwechsel	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl coa ligase	LOC_Os02g32490.1	2.40	5.27	glutamate degradation vii (to butyrate), oxidative ethanol degradation i				Lu-jun Yu et al.	Q6H798_ORYSJ	-1.84	2.95	6.43E-23	Os02g0525900
Transport	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	LOC_Os07g26690.1	0.68	1.60	pip2;5 (plasma membrane intrinsic protein 2;5)			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	PIP21_ORYSJ	-0.86	0.50	4.90E-10	Os07g0448800
Transport	transport.metabolite transporters at the mitochondrial membrane	LOC_Os09g28160.1	3.58	11.98	mitochondrial phosphate transporter	Chakrabarty D et al.	Norton G. J. et al.	Huang TL et al.		Q0J198_ORYSJ	-3.50	3.66	9.72E-122	Os09g0454600
Transport	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	LOC_Os04g52900.1	1.89	3.71	abc transporters			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q7XTT6_ORYSJ	-1.60	2.18	6.28E-28	Os04g0620066
Transport	transport.sugars	LOC_Os05g45950.1	1.64	3.12	voltage dependent anion channel 3					VDAC2_ORYSJ	-1.23	2.06	4.84E-17	Os05g0536200
Transport	transport.porins	LOC_Os03g10510.1	0.87	1.83	voltage dependent anion channel 2					VDAC5_ORYSJ	-0.67	1.08	1.20E-07	Os03g0202200
Elektronentransport	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c	LOC_Os05g23620.1	0.48	1.39	cytochrome c1					Q0DJC3_ORYSJ	-0.44	0.51	1.94E-05	Os05g0301700
Elektronentransport	not assigned.unknown	LOC_Os08g33460.1	0.67	1.59	NADH-ubiquinone oxidoreductase, 21kDa subunit					Q0J5I8_ORYSJ	-0.74	0.61	3.58E-08	Os08g0431500
Elektronentransport	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.complex I	LOC_Os03g62490.1	2.34	5.06	band_7_prohibitin phb band_7		Norton G. J. et al.			Q6AVQ4_ORYSJ	-2.15	2.53	5.90E-41	Os03g0841700

Elektronentransport	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.complex I	LOC_Os07g15880.1	1.32	2.49	mitochondrial prohibitin complex I			Q7EYR6_ORYSJ	-1.00	1.64	3.86E-17	Os07g0262200
Elektronentransport	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	LOC_Os12g33958.1	0.76	1.70	NADH dehydrogenase subunit 7			Q8HCQ3_ORYSJ	-0.51	1.01	9.89E-10	
Proteolyse	protein.degradation.cysteine protease	LOC_Os04g57440.1	0.85	1.80	jasmonic acid biosynthesis cysteine proteinase, putative			ORYB_ORYSJ	-0.75	0.95	6.73E-14	Os04g0670200
Proteolyse	protein.degradation.aspartate protease	LOC_Os11g08100.1	1.58	2.98	nucellin protein, putative			Q53NE7_ORYSJ	-1.53	1.63	2.16E-39	Os11g0183900
Proteolyse	protein.degradation	LOC_Os09g19820.1	1.77	3.40	aminopeptidase m1			Q6K4E7_ORYSJ	-1.54	2.00	3.71E-27	Os09g0362800
Proteolyse	protein.degradation.AAA type	LOC_Os03g58790.1	1.48	2.79	aaa-type ATPase family protein		Norton G. J. et al.	Q84SZ7_ORYSJ	-1.19	1.77	3.4615E-20	Os03g0802500
Proteolyse	protein.degradation.ubiquitin.E2	LOC_Os01g48280.1	0.60	1.52	ubiquitin-conjugating enzyme			Q8W0I1_ORYSJ	-0.76	0.44	1.52E-07	Os01g0673600
Proteinen mod.	protein.folding	LOC_Os03g64210.1	1.46	2.74	chaperonin-60alpha			Q7X9A7_ORYSJ	-1.01	1.91	2.60E-14	Os03g0859600
Proteinen mod.	protein.posttranslational modification.kinase.receptor like cytoplasmatic kinase VII	LOC_Os04g52840.1	2.26	4.80	protein serine/threonine kinase activity	'signalling.receptor kinases.S-locus glycoprotein like'		Q7XTU1_ORYSJ	-2.07	2.45	4.45E-39	Os04g0619400
Proteinen mod.	protein.folding	LOC_Os10g32550.1	1.28	2.43	protein.folding' heat shock protein 60		Norton G. J. et al.	Q8H903_ORYSJ	-0.82	1.74	6.51E-11	Os10g0462900
Proteinen mod.	protein.folding	LOC_Os06g02380.1	1.37	2.59	chaperonin, putativ			Q9LWT6_ORYSJ	-0.74	2.01	9.0255E-11	Os06g0114000

	Pathway	LOC	differ ence	fold	second desc	1	Paper ref	paper	uniprot	measurement 1	measu rement 2	p value			
in einem Run log ₂ zwischen 0,4und -0,4	'cell.cycle.peptidylprolyl isomerase'	LOC_Os02g02890.1	-0.86	-1.82	cyclophilin (cyp2) / rotamase				Lu-jun Yu et al.	Q6ZH98_ORYSJ	1.39	-0.34	1.57E-06	Os02g0121300	
	'cell.organisation'	LOC_Os09g23160.1	-0.48	-1.40	annexin-like protein					Q6H450_ORYSJ	0.16	-0.81	0.0008021	Os09g0394900	
	'cell.organisation'	LOC_Os02g07060.1	-0.40	-1.32	tubulin beta-5 chain				Lu-jun Yu et al.	Q0E3L8_ORYSJ	0.22	-0.58	0.00186792	Os02g0167300	
	'cell.organisation'	LOC_Os11g14220.1	-0.33	-1.26	tubulin alpha-2 chain				Lu-jun Yu et al.	Q0ITK1_ORYSJ	0.28	-0.38	0.00380694	Os11g0247300	
	'cell.organisation'	LOC_Os01g18050.1	-0.53	-1.44	tubulin beta-1 chain				Lu-jun Yu et al.	Q0JNK3_ORYSJ	0.73	-0.33	9.77E-11	Os01g0282800	
	'DNA.synthesis/chromatin structure.histone'	LOC_Os01g64640.1	-0.32	-1.25	histone h3.2					B7F6J5_ORYSJ	0.41	-0.23	0.00420594	Os01g0866200	
	'DNA.synthesis/chromatin structure.retrotransposon/transposase.hat-like transposase'	LOC_Os03g52310.1	-0.50	-1.41	hat family dimerisation domain containing protein					Q6AVI0_ORYSJ	0.60	-0.39	9.69E-06	Os03g0733400	
	'fermentation.PDC'	LOC_Os03g18220.1	-0.44	-1.36	pyruvate decarboxylase, putativ					PDC2_ORYSJ	0.33	-0.56	9.74E-05	Os03g0293500	
	'lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.pyruvate kinase'	LOC_Os04g58110.1	-0.39	-1.31	pyruvate kinase					Q7XKB5_ORYSJ	0.54	-0.24	0.00046174	Os04g0677500	
	'lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.pyruvate kinase'	LOC_Os11g05110.1	-0.29	-1.22	pyruvate kinase					Q2RAK2_ORYSJ	0.52	-0.05	4.17E-05	Os11g0148500	
	'lipid metabolism.lipid degradation.lysophospholipases.phospholipase D'	LOC_Os01g07760.1	-0.66	-1.58	phospholipase d	aba signaling				Lu-jun Yu et al.	Q0JQB1_ORYSJ	1.13	-0.20	0.0001787	Os01g0172400
	'nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.adenylate kinase'	LOC_Os12g13380.1	-0.47	-1.39	adenylate kinase 1					Q0IP84_ORYSJ	0.68	-0.26	0.00168798	Os12g0236400	
	'protein.degradation.AAA type'	LOC_Os07g47530.1	-0.91	-1.88	cell division cycle protein 48					Huang TL et al.	Q7X989_ORYSJ	1.44	-0.38	4.14E-06	Os07g0672500

'protein.degradation.aspartate protease'	LOC_Os05g04630.1	-0.43	-1.35	aspartic proteinase		ASPRX_ORYSJ	0.49	-0.37	0.00010965	Os05g0137400
'protein.glycosylation'	LOC_Os05g23600.1	-0.55	-1.46	ribophorin		Q0DJC5_ORYSJ	0.27	-0.83	0.00014406	Os05g0301500
'protein.glycosylation'	LOC_Os07g10830.1	-0.40	-1.32	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase		Q6ZLK0_ORYSJ	0.48	-0.33	0.0003215	Os07g0209000
'RNA.processing'	LOC_Os02g57590.1	-0.55	-1.46	fib2 (fibrillar in 2); snoRNA binding		Q6K701_ORYSJ	0.23	-0.87	0.00015552	Os02g0821800
'RNA.RNA binding'	LOC_Os03g61990.1	-0.47	-1.39	RNA binding / nucleotide binding		Q75LJ7_ORYSJ	0.78	-0.17	0.00155144	Os03g0836200
'RNA.RNA binding' 'amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.chorismate.3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase'	LOC_Os10g33230.1	-0.09	-1.06	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative / hnrrp, putative		Q7XDI5_ORYSJ	0.06	-0.12	0.00970428	Os10g0470900
'glycolysis.cytosolic branch.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)'	LOC_Os07g42960.1	-0.68	-1.60	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase, putative		AROG_ORYSJ	0.27	-1.10	9.98E-07	Os07g0622200
					XP_479895 Ahsan N et al. Ahsan N et al. Ahsan N et al.					
	LOC_Os02g38920.1	-0.70	-1.63	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase c subunit 1		Q6K5G8_ORYSJ	1.03	-0.37	3.17E-06	Os02g0601300
'not assigned.unknown'	LOC_Os04g56590.1	-0.38	-1.30		Norton G. J. et al.	Q7XQZ5_ORYSJ	0.30	-0.46	0.00082469	Os04g0661300
'not assigned.unknown'	LOC_Os02g04970.1	-0.32	-1.25	suppressor of auxin resistance1		Q6YWF9_ORYSJ	0.17	-0.47	0.00542879	Os02g0142500
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os05g01450.1	-0.59	-1.50	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit f		Q75M19_ORYSJ	1.11	-0.06	0.00091178	Os05g0104800
'protein.folding'	LOC_Os04g36890.1	-1.02	-2.03	rotamase		Q7XUX5_ORYSJ	0.39	-1.65	1.93E-07	Os04g0446500
'protein.folding'	LOC_Os03g42220.1	-0.80	-1.74	chaperonin, putative		Q6AV23_ORYSJ	0.07	-1.53	5.57E-06	Os03g0619400
'protein.folding'	LOC_Os05g05470.1	-0.37	-1.29	chaperonin, putative		Q6ASR1_ORYSJ	0.47	-0.26	0.00020253	Os05g0147400
'protein.folding'	LOC_Os04g46620.1	-0.36	-1.29	chaperonin, putative		Q7FAT6_ORYSJ	0.39	-0.34	0.0011448	Os04g0551800
'protein.folding'	LOC_Os06g47320.1	-0.36	-1.29	chaperonin, putative		Q653F6_ORYSJ	0.53	-0.20	0.00118476	Os06g0687700
'protein.folding'	LOC_Os06g34690.1	-0.43	-1.34	chaperonin, putative		Q5Z6U5_ORYSJ	0.48	-0.37	0.00068581	Os06g0538000
'protein.synthesis.initiation'	LOC_Os01g03070.1	-0.52	-1.43	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10		Q5ZEN1_ORYSJ	0.35	-0.68	9.22E-05	Os01g0120800
'protein.synthesis.initiation'	LOC_Os11g21990.1	-0.37	-1.29	eif4-gamma		Q2R678_ORYSJ	0.56	-0.19	0.00379955	Os11g0414000
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S24'	LOC_Os06g36160.1	-0.51	-1.42			Q5Z9S4_ORYSJ	0.28	-0.74	1.99E-06	Os06g0555400
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S13'	LOC_Os08g02410.1	-0.30	-1.23			RS132_ORYSJ	0.14	-0.45	0.00981631	Os08g0117300
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S15A'	LOC_Os02g27760.1	-0.59	-1.50			Q6K5R6_ORYSJ	0.85	-0.33	8.70E-05	Os02g0478600
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S25'	LOC_Os08g44480.1	-0.57	-1.48			Q6YZI2_ORYSJ	0.37	-0.76	9.00E-05	Os08g0559200
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.40S subunit.S4'	LOC_Os02g01560.1	-0.62	-1.54			Q0E4Q0_ORYSJ	0.91	-0.34	3.20E-05	Os02g0105900
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L11'	LOC_Os06g35730.1	-0.55	-1.46			B7EI57_ORYSJ	0.71	-0.38	9.46E-07	Os06g0550000
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L13A'	LOC_Os03g54890.1	-0.44	-1.36			Q75J18_ORYSJ	0.55	-0.34	7.31E-05	Os03g0756000
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L23A'	LOC_Os04g42270.1	-0.52	-1.44			Q0JBZ7_ORYSJ	0.34	-0.70	7.38E-05	Os04g0501000
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L26'	LOC_Os12g05430.1	-0.45	-1.36			Q2QXN5_ORYSJ	0.35	-0.54	5.49E-06	Os12g0150100
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L34'	LOC_Os08g33920.1	-0.51	-1.42			Q6Z537_ORYSJ	0.73	-0.29	0.00277495	Os08g0436800

protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L35	LOC_Os02g30050.1	-0.52	-1.43					Q6K667_ORYSJ	0.24	-0.81	0.00078279	Os02g0503400	
'protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L35A'	LOC_Os02g54470.1	-0.37	-1.29					Q6K8U8_ORYSJ	0.32	-0.43	0.00105677	Os02g0785800	
protein.synthesis.ribosomal protein.eukaryotic.60S subunit.L9	LOC_Os02g01332.1	-0.58	-1.49					Q0E4R7_ORYSJ	0.93	-0.22	0.0011069	Os02g0103700	
'RNA.regulation of transcription.Alfin-like'	LOC_Os07g41740.1	-0.51	-1.42	phd finger protein		Huang TL et al.		ALFL9_ORYSJ	0.35	-0.67	7.90E-06	Os07g0608400	
'RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator'	LOC_Os03g22730.1	-0.54	-1.46	sar DNA-binding protein, putativ		Norton G. J. et al.		Q0DRW2_ORYSJ	0.35	-0.73	0.0001837	Os03g0350100	
'RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator'	LOC_Os03g22880.1	-0.38	-1.30	<i>arabidopsis</i> homolog of nucleolar protein nop56				Q10LF8_ORYSJ	0.20	-0.55	0.0009329	Os03g0352300	
'signalling.G-proteins'	LOC_Os05g47890.1	-0.31	-1.24	receptor for activated c kinase 1 c				GBLPB_ORYSJ	0.42	-0.20	0.00549562	Os05g0552300	
'transport.Major Intrinsic Proteins.PIP'	LOC_Os02g41860.1	-0.32	-1.25	plasma membrane intrinsic protein 2;4		Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	PIP22_ORYSJ	0.22	-0.43	0.00442089	Os02g0629200	
'transport.potassium'	LOC_Os02g57240.1	-0.54	-1.45	probable voltage-gated potassium channel subunit beta				KCAB_ORYSJ	0.280	-0.79	0.00032291	Os02g0817500	
RNA.regulation of transcription.Zn-finger(CCHC)	LOC_Os02g32350.1	-0.52	-1.44					Q6H547_ORYSJ	0.38	-0.66	2.65448E-06		
'amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.misc.homoserine.aspartate semialdehyde dehydrogenase'	LOC_Os03g42110.1	0.63	1.55	n-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase				ARGC_ORYSJ	-0.39	0.86	2.95E-05	Os03g0617900	
'Biodegradation of Xenobiotics.3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase'	LOC_Os01g58380.1	0.36	1.28	3-hydroxybutyryl-coa dehydrogenase				Q8S1G9_ORYSJ	-0.29	0.43	0.00140968	Os01g0796400	
'cell.cycle.peptidylprolyl isomerase'	LOC_Os08g41390.1	0.54	1.46	rof1 (rotamase fkbp 1); fk506 binding		Huang TL et al.		Q7F1F2_ORYSJ	-0.25	0.84	7.34E-05	Os08g0525600	
'cell.division'	LOC_Os03g05730.1	0.58	1.50	cell division cycle protein 48, putative				Q10RP0_ORYSJ	-0.16	1.01	0.00097336	Os03g0151800	
'glycolysis.plastid branch.glucose-6-phosphate isomerase'	LOC_Os03g56460.1	0.72	1.64	glucose-6-phosphate isomerase	ascorbate biosynthesis			G6PIA_ORYSJ	-0.25	1.19	5.60E-05	Os03g0776000	
'lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.Acetyl CoA Carboxylation.homomeric Enzyme'	LOC_Os05g22940.1	0.48	1.39	acetyl-coenzyme a carboxylase 1				ACC2_ORYSJ	-0.32	0.64	2.09E-05	Os05g0295300	
'metal handling'	LOC_Os01g68770.1	0.57	1.48	selenium-binding protein 1				Q8RZW7_ORYSJ	-0.30	0.84	0.00014405	Os01g0916400	
'misc.cytochrome P450'	LOC_Os01g43710.1	0.96	1.94	cytochrome p450 72a1		Norton G. J. et al.		Q9FDZ1_ORYSJ	-0.39	1.53	1.46E-06	Os01g0627500	
'misc.glutathione S transferases'	LOC_Os01g72150.1	1.36	2.57	GST_tau		Chakrabarty D et al.	Norton G. J. et al.	Huang TL et al.	B7FAD4_ORYSJ	-2.68	0.04	0.00142429	Os01g0949900
'mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c reductase'	LOC_Os04g32660.1	0.41	1.33	ubiquinol-cytochrome c reductase				Q7XLG4_ORYSJ	-0.45	0.37	0.00030233	Os04g0398500	
'mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase'	LOC_Os06g43850.1	0.35	1.27	ATP synthase				Q0DAL0_ORYSJ	-0.23	0.47	0.00177711	Os06g0646500	
'mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase'	LOC_Os05g47980.1	0.44	1.36	ATP synthase				ATPBM_ORYSJ	-0.17	0.71	0.00312903	Os05g0553000	
'mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase'	LOC_Os09g08910.1	0.44	1.36	ATP synthase alpha				ATPAM_ORYSJ	-0.37	0.52	7.26E-05		
'mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear'	LOC_Os03g56300.1	0.44	1.35	NADH-ubiquinone oxidoreductase				Q8HCR7_ORYSJ	-0.18	0.69	0.00434076	Os03g0774200	
'not assigned.unknown'	LOC_Os07g14740.1	0.52	1.44					Q0D7G0_ORYSJ	-0.74	0.30	0.00030752	Os07g0251200	
'not assigned.unknown'	LOC_Os03g19452.1	0.56	1.48	six-bladed beta-propeller, tolB-like				Q10MI7_ORYSJ	-0.30	0.83	0.00016721	Os03g0307400	
'not assigned.unknown'	LOC_Os12g14930.1	0.72	1.65	ATP synthase				Q8HCR5_ORYSJ	-0.37	1.07	1.54E-06		
'nucleotide metabolism.degradation'	LOC_Os01g64520.1	0.30	1.23	urate oxidase				Q94CU3_ORYSJ	-0.29	0.31	0.00820677	Os01g0865100	
'OPP.non-reductive PP.transaldolase'	LOC_Os01g70170.1	0.83	1.77	transaldolase				Q5JK10_ORYSJ	-0.21	1.44	2.66E-05	Os01g0926300	

nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.nucleoside diphosphate kinase	LOC_Os07g30970.1	0.71	1.64	ndpk1; ATP binding / nucleoside diphosphate kinas				NDK1_ORYSJ	-0.4	1.02	1.76E-06	Os07g0492000	
'protein.degradation.cysteine protease'	LOC_Os04g55650.1	0.36	1.29	oryzain alpha chain				ORYA_ORYSJ	-0.46	0.27	0.00145545	Os04g0650000	
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os02g04100.1	0.45	1.37	proteasome subunit alpha type 1				Q0E466_ORYSJ	-0.23	0.67	0.00253614	Os02g0133800	
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os07g25420.1	0.49	1.40	26s proteasome non-ATPase regulatory subunit 8				Q8W423_ORYSJ	-0.28	0.70	0.00107799	Os07g0435100	
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os09g33986.1	0.52	1.43	peptidase/ threonine-type endopeptidase				Q9LST4_ORYSJ	-0.06	0.98	0.00316388	Os09g0515200	
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os02g21970.1	0.71	1.64	26s protease regulatory subunit 6b homolog				Q6Z875_ORYSJ	-0.27	1.15	0.0002512	Os02g0325100	
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os06g06030.1	0.59	1.51	proteasome subunit beta type 5 precursor				Q5VMN4_ORYSJ	-0.12	1.06	0.00083241	Os06g0153800	
'protein.degradation.ubiquitin.proteasom'	LOC_Os03g48930.1	0.58	1.49	proteasome subunit beta type 2				PSB2_ORYSJ	-0.14	1.01	0.0068505	Os03g0695600	
'protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin protease'	LOC_Os01g36930.1	0.57	1.49	ubiquitin-specific protease 6				Q5JK78_ORYSJ	-0.29	0.85	0.00014194	Os01g0550100	
'protein.targeting.nucleus'	LOC_Os01g13430.1	0.42	1.34	cellular apoptosis susceptibility protein		Norton G. J. et al.		Q0JP92_ORYSJ	-0.17	0.66	0.00542879	Os01g0235400	
'protein.targeting.nucleus'	LOC_Os03g64080.1	0.43	1.34	xpo1a; protein binding				Q84M87_ORYSJ	-0.18	0.67	0.00356612	Os03g0858100	
'PS.calvin cycle.transketolase'	LOC_Os06g04270.1	0.84	1.79	transketolase	pentose phosphate pathway (non-oxidative branch			Q0DEU8_ORYSJ	-0.20	1.48	1.94E-05	Os06g0133800	
'PS.photorespiration.serine hydroxymethyltransferase'	LOC_Os03g52840.1	0.40	1.32	serine hydroxymethyltransferase			Huang TL et al.	Lu-jun Yu et al.	Q7Y1F0_ORYSJ	-0.26	0.53	0.00038878	Os03g0738400
'RNA.processing.splicing'	LOC_Os02g04480.1	0.31	1.24	splicing factor, putative				Q6XY3_ORYSJ	-0.40	0.23	0.00619279	Os02g0137400	
'secondary metabolism.phenylpropanoids'	LOC_Os01g09010.1	0.83	1.78	anthranilate n-benzoyltransferase protein 1				Q9LQG6_ORYSJ	-0.06	1.60	0.0007148	Os01g0185300	
'signalling.14-3-3 proteins'	LOC_Os03g50290.1	0.43	1.35	general regulatory factor 7				Q10E23_ORYSJ	-0.11	0.74	0.00431703	Os03g0710800	
'signalling.14-3-3 proteins'	LOC_Os02g36974.1	0.44	1.35	general regulatory factor 7		Huang	Lu-jun Yu et al.	Q0E040_ORYSJ	-0.12	0.75	0.00356612	Os02g0580300	
'signalling.calcium'	LOC_Os04g32950.1	0.52	1.43	calnexin 1			Lu-jun Yu et al.	Q7XV86_ORYSJ	-0.17	0.87	0.00052054	Os04g0402100	
'signalling.G-proteins'	LOC_Os06g35814.1	0.30	1.23	ras-related protein ric2			Lu-jun Yu et al.	Q0DBM2_ORYSJ	-0.15	0.45	0.00711954	Os06g0551400	
'signalling.G-proteins'	LOC_Os05g49890.1	0.49	1.40	GTP-binding nuclear protein ran-b1				RAN2_ORYSJ	-0.31	0.66	1.48E-05	Os05g0574500	
'signalling.G-proteins'	LOC_Os02g37420.1	0.56	1.47	ras-related protein rab-2-b				Q6YY17_ORYSJ	-0.34	0.78	0.00018668	Os02g0586400	
'stress.abiotic.heat'	LOC_Os09g30418.1	0.60	1.51	heat shock protein 81-3				Q0J0U8_ORYSJ	-0.23	0.96	0.00076597	Os09g0482550	
'stress.abiotic.heat'	LOC_Os03g16860.1	0.82	1.77	heat shock protein 70		Huang TL et al.		Q10NA9_ORYSJ	-0.37	1.28	4.34E-06	Os03g0276500	
'stress.biotic'	LOC_Os09g21210.1	0.69	1.62	cell wall macromolecule catabolic process glycosyl hydrolase family 81 protein			Lu-jun Yu et al.	Q6H5B5_ORYSJ	-0.28	1.10	9.74E-05	Os09g0379900	
'TCA / org. transformation.other organic acid transformaitons.atp-citrate lyase'	LOC_Os12g37870.1	0.56	1.47	citrate synthase				ACLA3_ORYSJ	-0.21	0.90	0.00019676	Os12g0566300	
'TCA / org. transformation.TCA.IDH'	LOC_Os04g40310.1	0.32	1.25	isocitrate dehydrogenase 1				Q0JCD0_ORYSJ	-0.32	0.33	0.00405383	Os04g0479200	
'TCA / org. transformation.TCA.malate DH'	LOC_Os05g49880.1	0.47	1.38	malate dehydrogenase				Q6F361_ORYSJ	-0.24	0.70	0.00170654	Os05g0574400	
'TCA / org. transformation.TCA.pyruvate DH.E2'	LOC_Os02g01500.1	0.54	1.46	putative dihydroliipoamide s-acetyltransferase				Q6YPG2_ORYSJ	-0.05	1.03	0.00214461	Os02g0105200	
'TCA / org. transformation.TCA.pyruvate DH.E3'	LOC_Os01g22520.1	0.59	1.51	mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1				Q9ASP4_ORYSJ	-0.34	0.85	7.72E-05	Os01g0328700	
'TCA / org. transformation.TCA.succinyl-CoA ligase'	LOC_Os02g40830.1	0.87	1.82	succinyl-coa ligase				Q0DZG1_ORYSJ	-0.37	1.36	1.38E-06	Os02g0621700	

'transport.metabolite transporters at the envelope membrane'

LOC_Os01g45910.1

0.66 1.58

nucleotide transporter 1

Q5VQU1_ORYSJ

-0.40 0.92

1.10E-05 Os01g0647100

8.1.3 Spross

Tabelle 5: In ihrer Abundanz veränderte Proteine der Proteommessungen der Sprosse langzeitbehandelter Reispflanzen

misc.acid and other phosphatases hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.lipoxygenase	LOC_Os01g09540.1	-3.18	-9.06	acid phosphatase class b f		Q9LG77_ORYSJ	2.54	-3.82	1.2917E-07	Os01g0191200
cell.cycle.peptidylprolyl isomerase	LOC_Os12g37260.1	-2.83	-7.12	lox2 (lipoxygenase 2);		Q2QNN5_ORYSJ	2.77	-2.89	4.104E-60	Os12g0559200
cell.organisation	LOC_Os02g02890.1	-0.47	-1.38	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin (cyp2) / rotamas	Lu-jun Yu et al.	Q6ZH98_ORYSJ	0.49	-0.44	0.00022809	Os02g0121300
misc.glutathione S transferases	LOC_Os05g31750.1	-0.63	-1.55	annexin-like protein rj4		Q6L4C6_ORYSJ	0.77	-0.49	5.4407E-07	Os05g0382600
misc.peroxidases	LOC_Os10g39740.1	-0.43	-1.35	GST_phi		Q7XCK0_ORYSJ	0.45	-0.41	0.00079061	Os10g0543800
misc.peroxidases	LOC_Os04g59150.1	-1.53	-2.90	peroxidase 12 (per12)	Huang TL et al.	Q7XSV2_ORYSJ	1.00	-2.07	0.00015859	Os04g0688100
misc.peroxidases	LOC_Os02g14440.1	-1.53	-2.90	peroxidase, putative		Q6ER49_ORYSJ	1.10	-1.97	1.4859E-05	Os02g0240300
misc.rhodanese	LOC_Os02g49680.1	-0.75	-1.69	calcium sensing receptor		Q6YWR8_ORYSJ	0.49	-1.02	5.3239E-05	Os02g0729400
N-metabolism.ammonia metabolism.glutamine synthase	LOC_Os04g56400.1	-0.47	-1.39	glutamine synthetase 2		Q0J9E0_ORYSJ	0.47	-0.48	0.00048399	Os04g0659100
not assigned.unknown	LOC_Os05g32820.1	-1.71	-3.28	peptide-n4-asparagine amidase a		Q75HW4_ORYSJ	1.18	-2.25	6.1397E-05	Os05g0395000
not assigned.unknown	LOC_Os04g38390.1	-0.87	-1.82	lipid-associated family protein	Norton G. J. et al. Huang	Q7XRE7_ORYSJ	0.68	-1.06	4.3384E-06	Os04g0456700
not assigned.unknown	LOC_Os05g22614.1	-0.60	-1.51	plastid transcriptionally active 16		Q0DJF9_ORYSJ	0.57	-0.62	1.2278E-05	Os05g0291700
not assigned.unknown	LOC_Os01g03310.1	-3.43	10.76	bowman-birk type bran trypsin inhibitor		Q0JR29_ORYSJ	2.54	-4.32	0.00557959	Os01g0123900
protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	LOC_Os11g46000.1	-1.13	-2.18	zinc finger (c3hc4-type ring finger)		Q2QZH2_ORYSJ	1.16	-1.09	1.9093E-19	Os11g0687200
PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os10g21406.1	-0.83	-1.78	photosystem i subunit vii		PSAC_ORYSJ	0.44	-1.22	0.00712669	psaC Nip170
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os02g24634.1	-0.82	-1.77	photosystem q(a) protein		PSBD_ORYSJ	0.50	-1.15	1.2278E-05	
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os10g21310.1	-0.58	-1.49	photosystem ii p680 chlorophyll a apoprotein		PSBB_ORYSJ	0.43	-0.72	2.1552E-05	
redox.dismutases and catalases	LOC_Os02g02400.1	-1.20	-2.30	cat1 (catalase 1); catalase		CATA1_ORYSJ	0.72	-1.68	0.0002751	Os02g0115700
stress.abiotic	LOC_Os12g38170.1	-1.30	-2.47	osmotin-like protein, putative		Q2QND6_ORYSJ	0.95	-1.66	0.00012558	Os12g0569500
signalling.receptor kinases.misc	LOC_Os03g16950.1	0.80	1.74	33 kda secretory protein-related		Q10N98_ORYSJ	-0.91	0.70	1.412E-09	Os03g0277600
signalling.receptor kinases.misc	LOC_Os03g16960.1	0.81	1.76	33 kda secretory protein-related		Q10N97_ORYSJ	-0.87	0.75	1.0924E-09	Os03g0277700
in einem Run log ₂ zwischen	LOC_Os03g40270.1	-0.60	-1.52	reversibly glycosylated polypeptide 2		RGP1_ORYSJ	0.88	-0.32	0.00044977	Os03g0599800

development.unspecified	LOC_Os01g07780.1	-0.40	-1.32	lipase/lipoxygenase			Q94E65_ORYSJ	0.27	-0.52	0.00384867	Os01g0172800
misc.gluco-, galacto- and mannosidases.alpha-galactosidase	LOC_Os06g46284.1	-0.49	-1.41	alpha-glucosidase 1 (AGLU_ORYSJ	0.31	-0.67	0.0077925	Os06g0675700
misc.glutathione S transferases	LOC_Os03g04240.1	-0.52	-1.43	GST_ph			Q8H8D8_ORYSJ	0.65	-0.39	5.1555E-05	Os03g0135100
misc.glutathione S transferases	LOC_Os03g04220.1	-0.42	-1.33	GST_phi			Q8H8D6_ORYSJ	0.51	-0.32	0.00117809	Os03g0134900
misc.peroxidases	LOC_Os01g73170.1	-0.63	-1.55	peroxidase 12			Q5JMS4_ORYSJ	0.39	-0.88	0.00058081	Os01g0962700
misc.rhodanese	LOC_Os01g67120.1	-0.46	-1.37	calcium sensing receptor			Q0JGY3_ORYSJ	0.35	-0.57	0.00075679	Os01g0896500
OPP.oxidative PP.6-phosphogluconate dehydrogenase	LOC_Os06g02144.1	-0.48	-1.40	6-phosphogluconate dehydrogenase			Q9LI00_ORYSJ	0.60	-0.37	0.00015859	Os06g0111500
'protein.degradation.aspartate protease'	LOC_Os05g04630.1	-0.59	-1.50	aspartic proteinase precursor			ASPRX_ORYSJ	0.28	-0.89	0.00147891	
'protein.degradation.cysteine protease'	LOC_Os04g55650.1	-0.40	-1.32	oryzain alpha chain precursor			ORYA_ORYSJ	0.34	-0.46	0.00374244	
protein.degradation.metalloprotease	LOC_Os06g51029.1	-0.50	-1.42	ATP-dependent peptidase/ ATPase/ metallopeptidase			FTSH1_ORYSJ	0.28	-0.72	0.00662238	Os06g0725900
protein.synthesis.ribosomal protein.prokaryotic.chloroplast.30S subunit.S15	LOC_Os12g10580.1	-0.36	-1.28	large subunit of rubisco			RBL_ORYSJ	0.47	-0.25	0.00542154	Os12g0207600
PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os11g07020.1	-0.69	-1.62	fructose-bisphosphate aldolase			ALFC_ORYSJ	0.40	-0.99	0.00018028	Os11g0171300
PS.calvin cycle.aldolase	LOC_Os08g02700.1	-0.53	-1.44	fructose-bisphosphate aldolase			Q6YPF1_ORYSJ	0.27	-0.79	0.00396791	Os08g0120600
PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os08g44680.1	-0.62	-1.53	photosystem i subunit d-1			Q84PB4_ORYSJ	0.26	-0.97	0.00079061	Os08g0560900
PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	LOC_Os03g56670.1	-0.42	-1.34			Lu-jun Yu et al.	Q8S7H8_ORYSJ	0.39	-0.45	0.0019812	Os03g0778100
PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LOC_Os03g39610.1	-0.51	-1.43	chlorophyll a-b binding protein		Lu-jun Yu et al.	CB23_ORYSJ	0.34	-0.69	0.0001684	Os03g0592500
PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	LOC_Os11g13890.1	-0.36	-1.28				Q53N83_ORYSJ	0.37	-0.35	0.00542154	Os11g0242800
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os08g15322.1	-0.58	-1.50	psii cytochrome b559			PSBE_ORYSJ	0.38	-0.78	0.00167125	
PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	LOC_Os10g21212.1	-0.49	-1.40				PSBC_ORYSJ	0.30	-0.67	0.00879517	
RNA.regulation of transcription.unclassified	LOC_Os06g20120.1	-0.41	-1.33	chloroplast nucleoid DNA-binding protein, putative			Q6Z670_ORYSJ	0.34	-0.48	0.00289438	Os06g0305400
		-0.52	-1.43				Q7XK09_ORYSJ	0.25	-0.78	0.00504524	
		-0.43	-1.35				Q6H748_ORYSJ	0.48	-0.38	0.00077714	
amino acid metabolism.degradation.branched-chain group.shared	LOC_Os02g57260.1	0.45	1.36	peroxisomal 3-ketoacyl-coa thiolase 3	Jasmonsäure	Huang TL et al.	Q84P96_ORYSJ	-0.58	0.31	0.00103498	Os02g0817700
	LOC_Os07g44970.1	0.39	1.31	xpa-binding protein 2		Lu-jun Yu et al.	Q8LIB1_ORYSJ	-0.43	0.36	0.00396791	Os07g0644300
DNA.repair	LOC_Os03g27310.1	0.48	1.40	histone h3.2			H33_ORYSJ	-0.72	0.24	0.0093064	Os03g0390600
DNA.synthesis/chromatin structure.histone	LOC_Os03g52310.1	0.40	1.32	zinc finger bed domain-containing protein ricesleeper 2			Q6AVI0_ORYSJ	-0.41	0.39	0.00350432	
'DNA.synthesis/chromatin structure.retrotransposon/transposas e.hat-like transposase'	LOC_Os05g44922.1	0.39	1.31	6-phosphofructokinase			Q65X97_ORYSJ	-0.48	0.30	0.0045573	Os05g0524400
glycolysis.plastid branch.phosphofructokinase (PFK)	LOC_Os01g05670.1	0.40	1.32	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase/ fatty acid elongase/ trans-2-enoyl-coa reductase (NADPH)			Q5ZED1_ORYSJ	-0.58	0.23	0.00350432	Os01g0150000
lipid metabolism.exotics (steroids, squalene etc).trans-2-enoyl-CoA reductase (NADPH)	LOC_Os04g42320.1	0.42	1.34				Q0JBZ3_ORYSJ	-0.44	0.40	0.00211638	Os04g0501600
not assigned.unknown											

RNA_processing.splicing	LOC_Os05g07050.1	0.38	1.30	abnormal suspensor 2	Huang TL et al.	Q5WAB4_ORYSJ	-0.45	0.32	0.00540259	Os05g0163200
	LOC_Os02g05410.1	0.41	1.33	splicing factor 3b subunit 1		Q0E3Z1_ORYSJ	-0.52	0.29	0.00316155	Os02g0147300
	LOC_Os03g16860.1	0.40	1.32	heat shock protein 70		Q10NA9_ORYSJ	-0.55	0.24	0.00391854	Os03g0276500

In den Wurzeln hochreguliert
In den Wurzeln runterreguliert

In die gleiche richtung reguliert wie in der Studie
In der Studie hochreguliert
in der Studie herrunterreguliert

Ahsan N et al. comparative proteomics study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots

Chakrabrty D et al. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings

Norton G. J. et al. Rice-arsenate interactions in hydroponics: whole genome transcriptional analysis

Huang TL et al. Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots.

Lu-jun Yu et al. Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*)

8.2 Daten der quantitativen Metabolommessungen

Tabelle 6: Normalisierte Originaldaten der quantitativen Metabolommessungen

Notes: all outliers removed from data sets!!!

<u>Normalisierte Fläche unter der Messkurve</u>	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Mean Kontrolle	Std Kontrolle	As 10 µM 1	As 10 µM 2	As 10 µM 3	As 10 µM 4	As 10 µM 5	Mean As 10 µM	Std As 10 µM	As 100 µM 1	As 100 µM 2	As 100 µM 3	As 100 µM 4	As 100 µM 5	Mean As 100 µM	Std As 100 µM
	Alanine	205.1	161.6	201.0	245.0	111.9	184.9	50.4	150.3	223.1	126.2	125.4	159.2	156.9	39.9	286.4	241.9	68.8	416.9	448.9	292.6
Asparagine	50.9	39.5	60.6	49.8	50.6	50.3	7.5	58.2	34.9	42.4	145.5	121.3	80.5	49.8	606.9	347.8	274.9	470.3	936.5	527.3	261.2
Aspartic acid	897.0	1556.4	1300.0	842.0	616.4	1042.4	378.6	317.8	474.0	475.1	1076.8	840.5	636.8	312.1	931.0	1050.9	641.0	860.1	1019.3	900.4	163.3
Citric acid	24.7	166.6	225.7	223.7	164.1	161.0	81.8	348.7	164.8	253.7	297.3	296.3	272.2	68.8	288.2	220.5	275.5	160.8	174.4	223.9	57.6
Cysteine	1.1	4.5	2.0	1.6	1.3	2.1	1.4	106.2	91.9	90.6	23.4	12.9	65.0	43.4	132.1	111.1	85.7	13.1	17.0	71.8	54.4
Fructose	14753.4	48557.1	16833.5	28163.9	9102.6	23482.1	15635.2	20771.3	61942.9	40519.9	15910.4	29858.4	33800.6	18320.1	42809.6	56978.1	36342.2	3395.0	6648.5	29234.7	23357.6
Fumaric acid	17.7	24.6	22.9		32.6	24.4	6.2	29.0	19.3	51.7	32.1	73.9	41.2	21.7	15.8	47.3	26.2	48.0	25.0	32.5	14.4
Galactinol	20.4	29.3	24.0	25.0	33.9	26.5	5.2	34.2	88.5	44.5	68.3	83.4	63.8	23.8	277.1	151.1	256.9	226.5	349.3	252.2	72.4
Gluconic acid	4.8	3.7	5.8	4.5		4.7	0.8	4.3	4.9	3.5	2.1	2.1	3.4	1.3	10.9	2.4	2.1	1.0		4.1	4.6
Glucose	927.9	1509.3	824.0	1966.9	1733.6	1392.3	499.7	985.3	2782.5	1713.6	1050.6	1132.3	1532.9	756.2	1471.9	1369.0	4570.9	272.7	660.3	1669.0	1696.8
Glutamic acid	1883.3	2472.7	2251.7	1863.2	1110.2	1916.2	518.6	1262.7	1242.7	1129.9	1414.5	1449.1	1299.8	131.3	2373.4	2007.3	1460.0	1887.9	2628.9	2071.5	451.0
Glutamine	658.3	691.0	917.9	751.4	788.7	761.5	101.2	772.8	514.7	636.7	1828.4	1591.6	1068.8	598.3	4351.2	2820.2	2057.6	4649.9	6980.9	4172.0	1900.6
Glycine	150.0	220.1	127.8	455.2	286.0	247.8	131.5	710.0	688.6	595.8	1097.9	841.5	786.8	194.8	1341.5	1062.3	834.3	1449.6	1620.5	1261.6	313.4
Isoleucine	27.8	110.3	103.4	245.3	143.9	126.1	79.0	272.1	262.9	270.6	482.0	510.8	359.7	125.3	1004.7	841.0	464.9	1090.2	961.6	872.5	244.9
Lactic acid	581.6	2761.9	407.9	3482.1	3345.3	2115.8	1505.6	511.7	1345.8	700.6	3175.0	2383.7	1623.4	1134.7	411.0	362.7	643.9	5540.2	4265.6	2244.7	2470.4
Leucine	88.8	112.2	90.0	345.0	195.6	166.3	109.0	308.7	301.0	306.5	618.8	653.4	437.7	181.6	914.6	916.9	524.7	1366.6	1157.9	976.1	314.9
Lysine	25.9	0.5	25.4	98.5	68.3	43.7	39.1	95.3	72.6	102.0	163.8	213.4	129.4	57.8	259.2	271.0	157.5	287.0	330.4	261.0	63.8
Malic acid	377.6	592.0	620.2	658.4	516.6	553.0	110.9	862.0	469.7	669.3	930.8	685.2	723.4	180.9	481.4	506.0	404.5	240.2	272.7	381.0	120.2
Malonic acid	0.6	0.7	0.5	0.7	0.5	0.6	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.4	0.3	0.1
Methionine	2.4	4.6	3.3	2.6	2.2	3.0	1.0	6.6	10.7	7.7	7.6	9.7	8.5	1.7	10.0	7.0	4.5	3.7	2.6	5.6	3.0

Phenylalanine	38.9	43.3	47.7	66.3	47.2	48.7	10.4	125.9	104.6	111.8	157.7	141.7	128.3	21.7	170.0	110.5	71.6	128.5	201.6	136.5	50.8
Proline	123.5	142.9	151.8	318.6	56.9	158.7	96.8	637.2	381.4	334.5	852.4	764.1	593.9	229.2	1558.6	1831.9	1241.7	1434.2	1436.4	1500.6	217.2
Putrescine	199.5	362.6	242.9		283.4	272.1	69.4	796.2	638.5	604.2	721.4		690.1	86.2	1009.3	1290.3	736.4	1048.5	1032.1	1023.3	196.5
Pyruvic acid	18.8	54.7	18.5	28.8	24.8	29.1	14.9	40.1	41.7	39.3	41.0		40.5	1.0	34.8	37.7	38.6	43.0		38.5	3.4
Raffinose	3.0	5.3	2.7	2.2	4.6	3.5	1.3	5.1	10.3	6.3	5.9	9.9	7.5	2.4	29.7	11.8	35.6	6.9	23.4	21.5	12.0
Serine	352.1	544.2	399.7	907.8	556.9	552.1	217.9	905.3	734.8	734.4	1359.0	1227.2	992.1	287.3	1623.1	1486.2	982.0	2371.7	2589.7	1810.5	661.2
Shikimic acid	119.6	160.3	147.7	166.9	127.3	144.3	20.5	266.4	217.9	219.6	369.5	321.0	278.9	65.9	510.3	419.8	297.7	134.0	169.5	306.3	160.5
Succinic acid	340.1	730.1	353.6	712.1	346.9	496.6	205.1	493.1	467.4	511.1	278.6	320.2	414.1	106.8	431.5	336.8	1085.8	591.7	521.8	593.5	291.4
Sucrose	3863.5	10311.1	3485.5	2204.4	1958.4	4364.6	3422.0	4355.6	12656.9	8602.5	3683.0	10962.4	8052.1	3960.1	16468.3	14928.0	15652.7	8577.9	5503.8	12226.1	4887.2
Threonic acid	2.1	4.7	3.3	9.8	6.6	5.3	3.0	14.3	8.6	8.0	16.4	12.0	11.8	3.6	18.8	21.8	16.5	13.2	18.3	17.7	3.2
Threonine	134.1	358.8	135.8	417.0	191.5	247.5	131.9	213.9	337.4	250.1	316.5	459.3	315.4	94.5	674.6	611.9	330.3	611.2	524.7	550.5	134.2
Trehalose	50.4	72.8	53.4	36.3	50.8	52.7	13.1	71.8	63.9	74.7	43.2	45.9	59.9	14.6	191.0	199.2	186.4	164.3	224.9	193.2	22.0
Tryptophan	0.1	0.3	0.6	2.0	0.0	0.6	0.8	5.8	1.3	4.9	1.0	2.7	3.1	2.2	11.1	5.0	4.5	1.2	0.1	4.4	4.3
Tyrosine	168.4	171.5	185.3	208.8	171.3	181.1	16.9	359.8	268.1	330.1	413.7	416.5	357.6	62.0	392.8	411.7	298.2	396.0	442.3	388.2	54.0
Valine alpha- Ketoglutaric acid	218.9	362.5	209.6	528.9	329.5	329.9	129.8	434.1	546.2	454.8	595.8	687.5	543.7	104.1	1305.7	1184.9		1137.8	1141.4	1192.4	78.5
myo-Inositol	175.1	245.9	254.5	319.7	295.6	258.2	55.4	416.2	333.5	270.9	465.8	356.0	368.5	75.2	452.5	416.6	518.4	256.0	289.4	386.6	110.8

Tabelle 7: p-Werte des T-Tests und die Umrechnung zu fold change

	t-test Kontrolle vs. As 10 µM		t-test Kontrolle vs. As 100 µM		t-test As 10 µM vs. As 100 µM		Notes: Normalisierte Fläche unter der Messkurve	Mean Kontrolle	Mean As 10 µM	Mean As 100 µM	Kontrolle vs. As 10 µM	Kontrolle vs. As 100 µM
	significance	p-value	significance	p-value	significance	p-value					fold change	fold change
Alanine	-	0.47	-	0.23	-	0.13	Alanine	184.92	156.85	292.58	-1.18	1.58
Asparagine	-	0.25	*	0.02	*	0.01	Asparagine	50.27	80.47	527.29	1.60	10.49
Aspartic acid	-	0.21	-	0.51	-	0.16	Aspartic acid	1042.36	636.83	900.45	-1.64	-1.16
Citric acid	-	0.13	-	0.31	-	0.27	Citric acid	160.96	272.15	223.91	1.69	1.39
Cysteine	*	0.03	*	0.04	-	0.38	Cysteine	2.10	65.00	71.80	30.97	34.21
Fructose	-	0.18	-	0.57	-	0.57	Fructose	23482.13	33800.59	29234.67	1.44	1.24
Fumaric acid	-	0.73	-	0.75	-	0.56	Fumaric acid	24.44	41.21	32.47	1.69	1.33
Galactinol	*	0.01	**	0.00	**	0.01	Galactinol	26.51	63.78	252.18	2.41	9.51
Gluconic acid	-	0.33	-	0.39	-	0.37	Gluconic acid	4.69	3.39	4.11	-1.38	-1.14
Glucose	-	0.75	-	0.79	-	0.86	Glucose	1392.35	1532.86	1668.99	1.10	1.20
Glutamic acid	-	0.09	-	0.72	*	0.01	Glutamic acid	1916.22	1299.77	2071.49	-1.47	1.08
Glutamine	-	0.32	*	0.02	**	0.01	Glutamine	761.47	1068.85	4171.96	1.40	5.48
Glycine	***	0.00	***	0.00	**	0.01	Glycine	247.83	786.76	1261.64	3.17	5.09
Isoleucine	**	0.00	**	0.00	**	0.00	Isoleucine	126.14	359.66	872.49	2.85	6.92
Lactic acid	-	0.19	-	0.87	-	0.39	Lactic acid	2115.77	1623.38	2244.68	-1.30	1.06
Leucine	**	0.01	**	0.00	**	0.00	Leucine	166.32	437.67	976.14	2.63	5.87
Lysine	**	0.00	**	0.00	**	0.01	Lysine	43.73	129.42	261.00	2.96	5.97
Malic acid	-	0.17	-	0.12	*	0.04	Malic acid	552.96	723.40	380.95	1.31	-1.45
Malonic acid	**	0.00	*	0.02	-	0.84	Malonic acid	0.61	0.31	0.29	-2.00	-2.10
Methionine	***	0.00	-	0.12	-	0.17	Methionine	3.03	8.47	5.59	2.80	1.85
Phenylalanine	***	0.00	*	0.02	-	0.70	Phenylalanine	48.69	128.32	136.45	2.64	2.80
Proline	*	0.01	***	0.00	**	0.00	Proline	158.73	593.92	1500.56	3.74	9.45
Putrescine	-	0.92	-	0.92	-	0.51	Putrescine	272.10	690.11	1023.32	2.54	3.76
Pyruvic acid	-	0.35	-	0.20	-	0.44	Pyruvic acid	29.13	40.54	38.53	1.39	1.32
Raffinose	**	0.00	*	0.03	-	0.07	Raffinose	3.54	7.52	21.48	2.13	6.07
Serine	**	0.01	**	0.01	*	0.01	Serine	552.14	992.14	1810.52	1.80	3.28
Shikimic acid	*	0.01	-	0.10	-	0.79	Shikimic acid	144.35	278.90	306.25	1.93	2.12

Succinic acid	-	0.52	-	0.63	-	0.23	Succinic acid	496.55	414.10	593.53	-1.20	1.20
Sucrose	-	0.07	*	0.01	-	0.22	Sucrose	4364.57	8052.10	12226.12	1.84	2.80
Threonic acid	*	0.01	**	0.01	-	0.09	Threonic acid	5.30	11.83	17.74	2.23	3.35
Threonine	-	0.34	**	0.01	*	0.03	Threonine	247.45	315.43	550.53	1.27	2.22
Trehalose	-	0.32	***	0.00	***	0.00	Trehalose	52.75	59.90	193.16	1.14	3.66
Tryptophan	-	0.10	-	0.15	-	0.44	Tryptophan	0.59	3.15	4.37	5.36	7.45
Tyrosine	**	0.00	**	0.00	-	0.38	Tyrosine	181.09	357.64	388.20	1.97	2.14
Valine	*	0.01	***	0.00	**	0.00	Valine	329.87	543.65	1192.44	1.65	3.61
alpha-Ketoglutaric acid	-	0.06	-	0.06	-	0.75	alpha-Ketoglutaric acid	16.64	30.49	33.70	1.83	2.03
myo-Inositol	*	0.05	-	0.14	-	0.82	myo-Inositol	258.15	368.49	386.58	1.43	1.50

* < 0.05
 ** < 0.01
 *** < 0.001

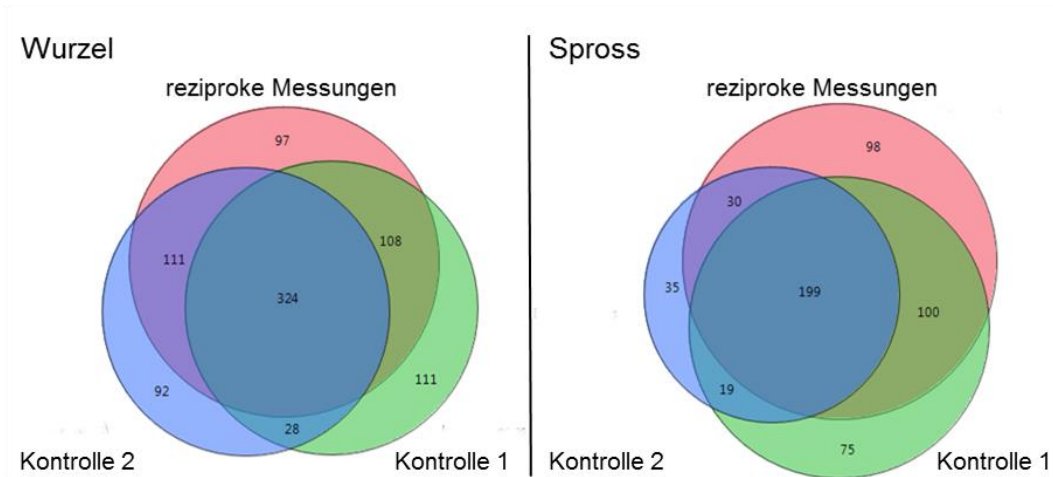
8.2.1 Venn-Diagramme: Die Schnittmenge der identifizierten Proteine zwischen den Kontrollen und den reziproken Messungen.

Um die Schnittmenge der identifizierten Proteine zwischen den Kontrollen und den Messdaten zu prüfen, wurden Venn-Diagramme erstellt. Es zeigt sich, dass ein Großteil der gemessenen Proteine auch in den Kontrollen wiederzufinden ist. Dass die Übereinstimmung nicht wesentlich größer ist, war zu erwarten. Für jede Kontrolle wurden zwei Messungen durchgeführt. Somit muss ein hier aufgeführtes Protein in zwei Messungen durch mindestens drei Peptide eindeutig identifiziert werden und in beiden Messungen vorkommen. Daten, die diese Bedingungen nicht erfüllen, wurden im Weiteren nicht betrachtet.

Interessanterweise driften die Kontrollen bei den langzeitbehandelten Wurzeln extrem auseinander. Statt 532 gemeinsamer Proteine wie in der Kurzzeitbehandlung können nur noch 352 Proteine in beiden Kontrollproben gefunden werden. In Prozent ausgedrückt, überlagern sich die beiden Kontrollen bei der Langzeitbehandlung der Wurzeln zu 45 % und bei der Kurzzeitbehandlung zu 66 %. Auch die langzeitbehandelten Sprosse zeigen nur eine Überlappung von 48% der beiden Kontrollen und liegen dabei zwischen den beiden Wurzelmessungen, aber näher bei der Langzeitbehandlung. Dies könnte auf eine starke Veränderung des Proteoms durch Arsen hindeuten, so dass einige Proteine über die Schwelle des Detektionsminimums treten, während andere dieses nun unterschreiten. Da die reziproken Proben jeweils aus einem Gemisch aus Referenz und mit Arsen behandeltem Pflanzenmaterial bestehen, wird das Detektionsminimum zumindest für einen der beiden Bestandteile in diesen Proben nicht unterschritten. Somit ist es denkbar, dass Proteine, die zunächst nicht detektiert werden konnten, in einem der Bestandteile der reziproken Proben über das Detektionslimit hinaus ansteigen. Zur Quantifizierung werden immer Peptide mit verschiedenen Stickstoffisotopen desselben Peptidpeaks verglichen. Daher werden in den reziproken Proben wahrscheinlich auch die ansonsten zu geringen Mengen detektiert, die in den Kontrollen nicht gemessen wurden. Das würde erklären, warum in Abbildung 23 bei den langzeitbehandelten Wurzelmessungen die Kontrollen auseinander driften, während die reziproken Messungen einen großen überlappenden Bereich mit beiden Kontrollen zeigen (70%). Ähnliches ist auch bei den Messungen der langzeitbehandelten Blätter zu beobachten. 72% der Proteine in einer der beiden Kontrollen können hier auch bei den reziproken Messungen wiedergefunden werden.

Die Tatsache, dass das Venn-Diagramm für die Kurzzeitbehandlung eine große Übereinstimmung der Kontrollen (66%) zeigt, stützt die oben dargelegte Vermutung. Wie Abbildung 25 zu entnehmen ist, sind bei der Kurzzeitbehandlung Änderungen im gemessenen Proteom nicht ersichtlich. Somit zeigen die Venn-Diagramme ein ähnliches Muster wie die Graphen 23-25.

Langzeitbehandlung



Kurzzeitbehandlung

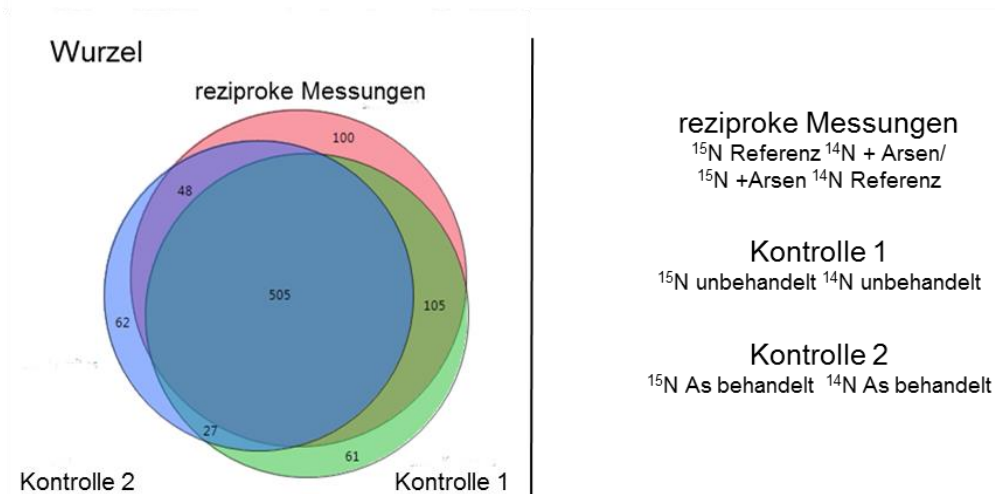


Abbildung 30: Venn-Diagramme der Messungen und Kontrollen

Diese Venn-Diagramme zeigen die Schnittmenge von in den Kontrollen identifizierten Proteinen und den Proteinen der reziproken Messungen.

So lassen sich aus den Graphen in Abbildung 23-25 und den Venn-Diagrammen erste Schlüsse ziehen über Veränderungen und die Qualität der Daten unter den verschiedenen Bedingungen. Bei der Behandlung von Pflanzen über einen längeren Zeitraum mit Arsenat zeigen diese Abbildungen starke Veränderungen im Proteom an. Die Änderungen in der Wurzel sind dabei deutlich stärker als die im Spross. Unter den gewählten Bedingungen konnten keinerlei Änderungen für die Wurzeln kurzzeitbehandelter Pflanzen gemessen werden. Analyse der veränderten Proteine langzeitbehandelter Pflanzen

8.3 Quellen der verwendeten Bilder

8.3.1.1 Abbildung 2:

A: Glutathionmolekül mit Säureamidbindung

Quelle: <http://www.gopatch.dk/glutathione/>

B: Oxidierte und reduzierte Form von Glutathion

Quelle: <http://www.chemgapedia.de>

8.3.1.2 Abbildung 6:

Quellen für die Bilder von links nach rechts.

<http://www-plb.ucdavis.edu/Labs/sundar/projects/riceMicrobiome.html>

<http://tweakyourbiz.com/marketing/2011/09/05/make-sure-you-measure-up/measure-your-marketing/>

<http://psc.cpsc.ucalgary.ca/acpc/2013/contest/problems/images/corn.jpg>

8.3.1.3 Abbildung 7:

Quellen für Skizze der Reispflanze.

<http://www-plb.ucdavis.edu/Labs/sundar/projects/riceMicrobiome.html>

8.3.1.4 Abbildung 11 sowie Tabelle 1 und 2 :

Die Quelle ist die Publikation Mühe, E. M. Eisele, J. F. Daus, B. Kappler, A. Harter, K. Are rice (*Oryza sativa* L.) phosphate transporters regulated similarly by phosphate and arsenate? A comprehensive study. *Plant Mol Biol*, 2014 [28]

Modifikationen: Die Bilder wurden deutsch beschriftet. Die Tabellen wurden neu erstellt und deutsch beschriftet.

DANKSAGUNG

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich durch Rat in wissenschaftlichen Dingen aber auch in puncto Ausdauer, bei Rückschlägen etc. immer unterstützt hat. Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, die mich in jedem nur erdenklichen Punkt unterstützt und gefördert haben.

Außerdem möchte ich mich bei den Personen, die an Teilen der Arbeit mitgewirkt haben, bedanken:

- Dr. Eva Marie Mühe, deren Projekt Überschneidungen mit dem meinen hatte und die z.B. mittels der gezeigten Keimungsexperimente einige der Grundlagen für diese Doktorarbeit gelegt hat, zusammen mit ihrem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Kappler.
- Prof. Dr. Waltraud Schulze für die angenehme Zusammenarbeit und die enorme Unterstützung bei allen Fragen rund um die Proteomik und die Mascot-Auswertung meiner Daten.
- Den Mitarbeitern des Proteomzentrums in Tübingen, sowie den Mitarbeitern der Serviceeinheit Massenspektrometrie für die Messung unserer Proben.
- Dr. Thomas Nägele und Prof. Dr. Wolfram Weckwerth von der Molecular Systems Biology an der Uni Wien für ihre Hilfe und die Messung der Metabolomdaten.
- Dr. York Stierhoff (ZMBP) für die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder und die zugehörigen Schnitte.
- Sven Fillinger, der bei der statistischen Auswertung der Proteomdaten eine große Unterstützung war.
- Dr. Christina Chaban, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, genau wie Prof. Dr. Klaus Harter.

Mein Dank gilt weiterhin meinen Kollegen aus dem Labor 220/ Bay 6 (Sven, Abi und Tobi), mit denen ich sowohl im Labor als auch privat viele schöne Stunden erleben durfte und die mich auch im Labor unterstützt haben.

Auch allen anderen Kollegen am ZMBP danke ich für die tollen wissenschaftlichen und privaten Aktivitäten und Gespräche. Ganz herzlichen Dank auch an Gert Huber und die anderen Mitarbeiter der Gärtnerei des ZMBPs für die wertvolle Hilfe bei der Aufzucht der Reispflanzen.

Außerdem ein großer Dank an Susanne Gillig, die mir unter anderem bei der Korrektur dieser Arbeit zur Seite stand und mich auch ansonsten animiert hat, beim Schreiben kritisch und genau zu bleiben, sowie an Ewout Schouten für seine Hilfe im Kampf mit der Formatierung.