

**Charakterisierung der *Nicotianamin Synthase*
Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* im Kontext der
Metallhomöostase**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von Herrn

Marco Klatte

geboren am 13.09.1975 in Kassel

August 2008

Tag des Kolloquiums: 15.01.2009

Dekan: Prof. Dr. Uli Müller

Berichterstatter: Junior Prof. Dr. Petra Bauer
Abteilung Botanik, Universität des Saarlandes
Prof. Dr. Jörn Walter
Abteilung Genetik, Universität des Saarlandes
Prof. Dr. Rüdiger Hell
Abteilung Molekulare Pflanzenbiologie, Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, im August 2008

.....

für meine liebe Frau Sabina,
Lena und Lukas

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung	viii
Summary	ix
1 Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung von Metallen, insbesondere Eisen, in der Physiologie	1
1.1.1 Eisen	2
1.1.2 Kupfer	5
1.1.3 Zink	6
1.2 Die Homöostase des Metallhaushalts höherer Pflanzen	8
1.2.1 Mobilisierung und Aufnahme	9
1.2.2 Bindung von Metallen durch Chelatoren	14
1.2.3 Interzelluläre Verteilung der Metallionen in der Pflanze	16
1.2.4 Intrazelluläre Verteilung und Speicherung	18
1.2.5 Remobilisierung und Translokation	19
1.2.6 Die Regulation der Metall Homöostase	20
1.3 Nicotianamin	24
1.3.1 Die Tomatenmutante <i>chloronerva</i>	24
1.3.2 Chemische Struktur und Eigenschaften von Nicotianamin	25
1.3.3 Der Effekt von Nicotianamin in der Eisen- und Kupferhomöostase	27
1.3.4 Nicotianamin Synthase	27
1.3.5 Transporter von Nicotianamin	29
1.3.6 Die Rolle von NA bzw. <i>NAS</i> Genen in der Metall Homöostase höherer Pflanzen	31
1.4 Modifizierung der Metallhomöostase mittels der grünen Gentechnik - Optimierung der Effizienz von Kulturpflanzen	33
1.4.1 Eisenmangel in der menschlichen und pflanzlichen Ernährung - konventionelle Lösungsansätze	33

1.4.2	Das Potential von in der Metallhomöostase optimierten, transgenen Kulturpflanzen	34
1.4.3	Langfristige Entwicklung von Fe optimierten Kulturpflanzen	36
1.5	Die Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.5.1	Transkriptomanalyse	38
1.5.2	„reverse genetics“ durch T-DNA Mutagenese	38
2	Zielsetzung der Arbeit	40
3	Material und Methoden	42
3.1	Material	42
3.1.1	Pflanzenmaterialien	42
3.1.2	Chemikalien	43
3.1.3	PCR Primer	43
3.1.4	Materialien	46
3.1.5	Geräte	46
3.1.6	Kits & Enzyme	47
3.1.7	Lösungen und Puffer	47
3.1.8	Kulturmedien	48
3.2	Pflanzenmethoden	49
3.2.1	Pflanzenanzucht	49
3.2.2	Kreuzung von <i>A. thaliana</i>	52
3.2.3	Isolation genomischer DNA (gDNA) für Genotypisierungen	52
3.2.4	Ernte und Materialaufbereitung von Pflanzenmaterial für weiterführende Analysen	53
3.3	Bestimmung der Metallgehalte	53
3.4	Bestimmung der NA Gehalte in Pflanzenextrakten	54
3.4.1	Etablierung der NA Quantifizierung mittels HPLC	54
3.4.2	Technische Beschreibung der Methoden zur NA Analyse	58
3.5	Expressionsanalysen	60
3.5.1	Expressionsanalyse mit der semi-quantitativen RT-PCR	60
3.5.2	Expressionsanalyse mittels real-time qPCR	61
3.6	Bestimmung der Fe Chelat Reduktase Aktivität	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Charakterisierung der <i>NAS</i> Genfamilie	68
4.1.1	Die Phylogenie der <i>NAS</i> Genfamilie	68
4.1.2	Differentielle Expression der <i>NAS</i> Gene	69
4.2	Generierung der <i>nas</i> T-DNA Kollektion	71
4.2.1	Identifizierung und Verifizierung der <i>nas</i> T-DNA Insertionslinien	72
4.2.2	Generierung der <i>nas1-1nas2-1</i> und <i>nas3-1nas4-1</i> Doppelmutanten	74
4.2.3	Generierung der Dreifach- und Vierfachmutanten	74
4.3	Verifizierung und analytische Charakterisierung der <i>nas</i> T-DNA Mutationen	76

4.3.1	Überprüfung von <i>NAS</i> Volllänge cDNA	76
4.3.2	Bestimmung der NA Gehalte	77
4.3.3	Bestimmung der Metallgehalte	79
4.4	Physiologische Charakterisierung der <i>nas</i> T-DNA Kollektion	81
4.4.1	Beschreibung des <i>nas</i> Phänotyps	81
4.4.2	Einfluss der <i>nas</i> Mutationen auf die Toleranz gegenüber Metallstress	83
4.4.3	Analyse der <i>NAS</i> Genexpression unter Ni-Stress	87
4.4.4	Untersuchungen der <i>nas4x-1</i> Mutante im Kontext der Fe Homöostase	89
4.4.5	Integration der <i>NAS</i> Gene in das Netzwerk der Fe Homöostase . . .	90
4.5	Genetische Interaktion zwischen den <i>NAS</i> Genen und <i>FIT</i>	95
4.5.1	Charakterisierung einer <i>nas4x-1fit-3</i> Fünffachmutante	95
4.5.2	Untersuchung der <i>NAS</i> Genexpression in Abhängigkeit von <i>FIT</i> . .	96
4.6	Austausch des <i>nas2-1</i> Allels - Generierung der <i>nas4x-2</i> Mutante	97
5	Diskussion	99
5.1	Charakterisierung der <i>NAS</i> Genfamilie	99
5.2	Generierung und Bewertung der <i>nas4x-1</i> Mutante	101
5.3	Der Einfluss des NA Mangels auf die Physiologie der <i>nas4x-1</i> Mutante . . .	103
5.3.1	NA wirkt hauptsächlich in der Fe Homöostase	103
5.3.2	Einordnung der <i>NAS</i> Gene in das regulatorische Netzwerk der Fe Homöostase	106
5.3.3	Änderungen in der Verteilung von Metallen unter NA Mangel - die Rolle von NA in Transport und Verteilung weiterer Metalle	107
5.4	Nicotianamin vermittelt Toleranz gegenüber Nickel, aber nicht gegenüber Zink	108
6	Schlussfolgerungen und Perspektiven	110
	Anhang	a
	Literaturverzeichnis	d
	Liste der Publikationen	r
	Danksagungen	t
	Curriculum vitae	u

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung der Nährelemente im Periodensystem der Elemente.	2
1.2	Vereinfachte Darstellung des Metallhomöostase Netzwerks in höheren Pflanzen.	8
1.3	Strategie I und II der Eisenaufnahme durch höhere Pflanzen.	10
1.4	Syntheseweg des Nicotianamins und der Phytosiderophore.	13
1.5	Darstellung des Phänotyps der Tomatenmutante <i>chloronerva</i>	25
1.6	Darstellungen der Struktur von Nicotianamin.	26
1.7	Vergleich der NAS Aminosäure Sequenzen.	28
1.8	Phylogenetische Verwandtschaft der NAS Proteine.	29
1.9	Phylogenetische Verwandtschaft der YSL Proteine.	30
3.1	Schematische Darstellung der T-DNAs.	43
3.2	Anzucht von <i>A. thaliana</i>	50
3.3	Derivatisierung von Nicotianamin mittels Fmoc-Cl	54
3.4	Separation und Detektion von NA mittels HPLC.	56
3.5	Etablierung der NA Bestimmung mittels HPLC.	57
3.6	Primer Optimierung in der real-time qPCR durch die verkürzte Primer Matrix.	63
3.7	Experimentelles Design der real-time qPCR.	64
3.8	Überprüfung der Qualität der real-time qPCR.	66
4.1	Darstellung der <i>NAS</i> Genfamilie in <i>A. thaliana</i>	68
4.2	Gewebespezifische Expression der <i>NAS</i> Gene.	70
4.3	Differentielle Expression der <i>NAS</i> Genfamilie in Antwort auf Variationen in der Metallversorgung.	71
4.4	Identifizierung und Verifizierung annotierter <i>nas</i> T-DNA Insertionsmutanten.	72
4.5	Kreuzungsschema der Generierung der <i>nas</i> T-DNA Kollektion.	75
4.6	Nachweis von <i>NAS</i> Volllänge cDNA in der <i>nas4x-1</i> Mutante.	77
4.7	Blattphänotypen von Wild Typ und <i>nas4x-1</i> zum Zeitpunkt der Materialern- te für NA Messungen.	78
4.8	Bestimmung der NA Gehalte der <i>nas4x-1</i> Mutante.	79
4.9	Bestimmung der Metallgehalte der <i>nas4x-1</i> Mutante.	80
4.10	Phänotypen von <i>nas</i> T-DNA Insertionsmutanten auf Erde.	82

4.11 Phänotypen von <i>nas</i> T-DNA Insertionsmutanten unter Metallstress auf Hoagland Agar.	84
4.12 Quantifizierung des verminderten Wurzelwachstums von <i>nas</i> T-DNA Insertionsmutanten unter Ni-Stress	86
4.13 Bewertung der Ni-Sensitivität der <i>nas</i> T-DNA Insertionsmutanten unter Ni-Stress.	87
4.14 Expressionsanalyse der <i>NAS</i> Gene unter Ni Stress	88
4.15 Bestimmung der Fe Chelat Reduktase Aktivität in der <i>nas4x-1</i> Mutante.	89
4.16 Bestimmung der Metallgehalte von Wild Typ und <i>nas4x-1</i> Mutante unter Fe Mangel.	90
4.17 Vergleichende Expressionsstudien zwischen Wild Typ und <i>nas4x-1</i> Mutante im Kontext der Fe Homöostase.	92
4.18 Vergleichende Expressionsstudien der <i>YSL</i> Gene zwischen Wild Typ und <i>nas4x-1</i> Mutante im Kontext der Fe Homöostase.	94
4.19 Charakterisierung der <i>nas4x-1fit-3</i> Fünffachmutante im Kontext der Fe Homöostase.	95
4.20 Abhängigkeit der <i>NAS</i> Genexpression von <i>FIT</i>	97
4.21 Integration des <i>nas2-2</i> Allels in die <i>nas</i> T-DNA Kollektion.	98
5.1 Hypothetisches Modell über die Speicherung und Remobilisierung von Fe in Blättern.	100
5.2 Hypothetisches Modell über die Rolle des NA in der Fe- und Metallhomöostase.	104
A.1 Chromatogramm zur Analyse des NA Gehalts in Blättern der <i>nas4x-1</i> Mutante und Wild Typ.	a
A.2 Alignment der kodierenden Sequenzen der <i>NAS</i> Gene aus <i>A. thaliana</i> und <i>S. esculentum</i>	b

Abkürzungsverzeichnis

ABA	abscisic acid , Abscisinsäure
ABRC	A rabidopsis B iological R esource C entre
AHA	A utoinhibited H ⁺ - A TPase (Selbstinhibierende H ⁺ ATPase)
ATP	A densosin-5'- T riphosphat
BHLH	b asic h elix l oop h elix Transkriptionsfaktor
CDF	c ation d iffusion f acilitator
cDNA	c omplementary DNA (komplementäre DNS)
conserved	
Cu	Kupfer (lat. C uprum)
DMA	2'- D eoxymugineic a cid (2'-Deoxymugeinsäure)
DNA	D eoxyribonucleic a cid (DNS, Desoxyribonukleinsäure)
EIL1	E IN3- L ike1
EIN3	E thylen i nsensitive 3
EMS	E thylmethansulfonat, ein Mutagen
epiHMA	3-(e pi) H ydroxy M ugineic a cid (3-(epi)Hydroxy-Mugininsäure)
ERE	e thylen responsive e lement
EST	E xpressed s equences t ag
Fe	Eisen (lat. F errum)
FIT	f er-like iron deficiency induced transcription factor
frd	F erric chelate r eductase d efective (<i>Arabidopsis</i> Mutante defekt in der Funktion der Eisen-Chelat Reduktase)
FRO	F erric R eduction O xidase (Eisen-Chelat-Reduktase)
GAPDH	G lycerinaldehyd-3- P hosphat- D ehydrogenase
gDNA	g enomische DNA
HMA	H ydroxy M ugineic a cid (Hydroxy-Mugininsäure)
HMA	h eavy- m etal-transporting P-type A TPases (Transporter)
Hv (Genname)	Gen der Gerste, <i>Hordeum vulgare</i>
IDE1/2	iron d eficiency responsive e lement 1/2
IDRS	iron- d ependent regulatory s equences
iron Transport Protein	
IRT	I ron r egulated transporter (Eisen-regulierter Transporter)
ITP	iron t ransport p rotein

Le / Se (Genname)	Gen der Tomate, <i>Solanum esculentum</i> , vormals <i>Lycopersicum esculentum</i>
LVI	limiting volume insert, Autosamplerröhrchen
MA	M ugineic a cid (Mugininsäure)
MATE	M ultidrug and e fflux f amily, Family von Transportern kleiner organischer Moleküle
Mn	Mangan
MT	M etallothioneine
MTP	m tal t olerance p rotein
NA	N icotianamin
NAAT	N icotianamin- A minotransferase
NAS	N icotianamin- S ynthase
NASC	N ottingham A rabidopsis S tock C entre
NRAMP	n atural r esistance a ssociated m acrophage p rotein
OPT	O ligo P eptid T ransporter
Os (Genname)	Gen des Reis, <i>Oryza sativa</i>
PC	P hytochelatine
pCaMV-35S	35S Promotor des C auliflowermosaicvirus (Blumenkohlmosaikvirus)
PS	P hytosiderophor
Ps (Genname)	Gen der Erbse, <i>Pisum sativum</i>
RFLP	R estriktionsfragment L ängen p olymorphismus
ROS	r eactive o xygen s pecies
RT	R aumtemperatur
RuBisCO	R ibulose-1,5- B isphosphat- C arboxylase/- O xygenase
SAM	S - A denosyl- M ethionin
UTR	u ntranslated r egion, nicht translatierter Bereich der mRNA
YAC	y east a rtificial c hromosome, künstliches Hefechromosom
ys1	Y ellow s tripe 1 , Maismutante mit Defekt in der PS-Aufnahme
YSL	Y ellow- s tripe1-like, zu YS1 analoge Transporter und somit potentielle Transporter von NA-chelaten
ZIP	Z RT, I RT-like p roteins (ZRT/IRT artige Proteine)
Zm (Genname)	Gen aus Mais, <i>Zea mays</i>
Zn	Zink
ZRT	z inc r egulated t ransporter, aus <i>S. cerevisiae</i>

Zusammenfassung

Die nicht proteinogene Aminosäure Nicotianamin (NA) ist ein in höheren Pflanzen ubiquitärer und essentieller Chelator von Schwermetallen. In Gramineen fungiert NA als direkte biochemische Vorstufe in der Synthese der Phytosiderophore und ist damit indirekt an der Aufnahme von Fe und Zn in die Wurzel beteiligt. Wie die NA freie, semi-sterile Tomatenmutante *chloronerva* zeigt, erfüllt NA auch in Nicht-Gramineen eine essentielle Funktion, die bislang jedoch nicht genau verstanden ist. Mit zunehmender Verbreitung der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ergaben sich vielfältige neue, für *Tomate* nicht verfügbare Untersuchungsmethoden, die einen Transfer der Erforschung des NA Mangels auf *A. thaliana* für langfristige Studien attraktiv machten.

In der vorliegenden Arbeit wird die Generierung und Charakterisierung einer auf T-DNA Mutagenese beruhenden und die vier *Nicotianamine Synthase (NAS)* Gene betreffenden Mutantenkollektion in *A. thaliana* beschrieben. Die Analyse der fertilen *nas4x-1* Mutante ergab eine geringe NAS Restaktivität, die sich in deutlich verringerten, aber detektierbaren NA Gehalten äußerte. Dennoch wurden umfassende Veränderungen in den Metallgehalten sowie der Genexpression bekannter, in der Metallhomöostase involvierter Gene beobachtet, wodurch eine bessere Integration der *NAS* Gene in das Netzwerk der Metallhomöostase ermöglicht wurde. Die durchgeführten Analysen deuteten insbesondere auf eine essentielle Funktion des NA in der Entwicklung der reproduktiven Organe hin. Darüber hinaus wurden Hinweise auf eine essentielle Funktion des NA in der Toleranz gegenüber dem Schwermetall Nickel sowie gegenüber Eisenmangel gewonnen. NA ist demnach essentiell sowohl in der Ernährung als auch in der Detoxifizierung von Metallen. Darüber hinaus erfüllt es essentielle Aufgaben in der vegetativen und reproduktiven Phase der Pflanzenentwicklung.

Summary

The non-proteinogenic amino acid nicotianamine (NA) is essential for chelation and transport of iron and other micronutrient metal ions in higher plants. In graminaceous plants, NA is the direct precursor in the synthesis of phytosiderophores and thus directly involved in the acquisition and uptake of essential metal ions from the soil. However, due to the analysis of the NA free and semi-sterile tomato mutant *chloronerva*, an essential role of NA also in non-graminaceous plants is generally accepted. With the establishment of *Arabidopsis thaliana* as the major dicot model plant many new methods were developed which are not available in Solanaceous species. Thus, a change of the model species to investigate loss of NA in *A. thaliana*, became attractive.

Due to the *NAS* gene family structure in *A. thaliana* multiple *nas* mutants were constructed, enabling the identification of intermediate *nas* mutant phenotypes to study NA production and transport during reproduction. The *nas4x-1* mutant, being mutated at all four *NAS* genes, contained drastically reduced but still detectable amounts of NA, enabling the mutant to sustain its life cycle. Anyway, global changes in metal homeostasis and the expression of known metal homeostasis genes were detected in the *nas4x-1* mutant, leading to a better understanding and integration of the *NAS* genes into the network of metal homeostasis. The obtained results strongly indicate an essential role of NA in the development of flowers and seeds. Furthermore, it was shown that an increasing number of *nas* mutations leads to a higher sensitivity against high amounts of nickel as well as iron deficiency. Thus, NA plays essential roles in metal nutrition and metal detoxification both at vegetative and reproductive stage of plant development.

1 Einleitung

Die Aufnahme von Kohlenhydraten, Eiweißen und Fetten dient in der menschlichen Ernährung zur Deckung des Energiebedarfs und zur Lieferung von Bausteinen zur körpereigenen Synthese dieser Stoffklassen. Darüber hinaus benötigt der menschliche Körper aber auch Vitamine und Mineralstoffe, um eine optimale Funktion des Körpers sicher zu stellen. Die Mineralstoffe werden entsprechend des Bedarfs in Mengen- und Spurenelemente (analog zu Makro- und Mikronährelementen in der Pflanzenernährung) eingeteilt. Angesichts der schwerwiegenden Folgen von Mangelkrankungen, z. B. der Eisenmangel-Anämie, wird die Wichtigkeit der Mineralstoffversorgung in der menschlichen Ernährung deutlich (vgl. Abschnitt [1.1.1.4](#) / S. 4).

Aber nicht nur die Physiologie des Menschen hängt entscheidend von der Versorgung mit Mineralstoffen ab, sondern die Physiologie jedes Lebewesens. Dabei ist zu beachten, dass die Einordnung bestimmter Mineralstoffe, insbesondere die Einordnung als essentielles Nährelement, in Abhängigkeit vom betrachteten Organismus durchaus unterschiedlich ausfallen kann. In [Abbildung 1.1](#) ist die Einordnung der Nährelemente für höhere Pflanzen entsprechend [[Marschner \(1995\)](#)] dargestellt.

1.1 Die Bedeutung von Metallen, insbesondere Eisen, in der Physiologie

Die Gruppe der für Pflanzen essentiellen Mikronährstoffe besteht überwiegend aus Vertretern der Schwermetalle der vierten Periode, deren wichtigste Vertreter, Eisen (Fe), Mangan (Mn), Kupfer (Cu) und Zink (Zn), als Cofaktoren von Enzymen an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt sind. Im folgenden soll die biologische Bedeutung der einzelnen Metalle in Pflanzen näher beleuchtet werden, wobei der Schwerpunkt hierbei wie auch im Rest der vorliegenden Arbeit auf Eisen liegen soll.

1 H Wasserstoff																	2 He	
3 Li	4 Be																	10 Ne
11 Na Natrium	12 Mg Magnesium																	18 Ar
19 K Kalium	20 Ca Calcium	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn Mangan	26 Fe Eisen	27 Co Kobalt	28 Ni Nickel	29 Cu Zink	30 Zn Kupfer	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo Molybdän	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd Cadmium	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
55 Cs	56 Ba	57-71 La-Lu Lanthaniden	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn	
87 Fr	88 Ra	89-103 Ac-Lr Actiniden	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	114 Uuq						

■ organische Grundelemente
■ Makronährelemente
■ essentielle Mikronährelemente
■ Mikronährelemente, essentieller Charakter nicht eindeutig belegt
■ potentielle Chelatierungspartner von Nicotianamin

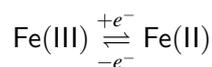
Abbildung 1.1: Darstellung der für Pflanzen wichtigen Nährelemente im Periodensystem der Elemente nach [Marschner (1995)]. Der Chelator Nicotianamin ist ein möglicher Ligand der rot umrandeten Schwermetalle, die größtenteils essentielle, aber im Fall des Cadmium auch keine nachgewiesene physiologische Funktion in höheren Pflanzen erfüllen.

1.1.1 Eisen

1.1.1.1 Chemische Eigenschaften und biologische Bedeutung

26	55,85
Fe	
Eisen	
$3d^6 4s^2$	

 Mit einem Anteil von ca. 4,7% ist Eisen eines der häufigsten Metalle der Erdkruste und das viert häufigste Element überhaupt. Sprosse von höheren Pflanzen enthalten in etwa $100 \text{ mg Fe kg}^{-1}$ Trockenmasse [Marschner (1995)]. Als Übergangsmetall kann Eisen sowohl in der Oxidationsstufe +II als auch +III vorliegen:



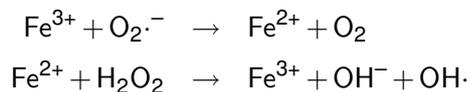
Durch die Oxidation mit atmosphärischem Sauerstoff liegt Eisen vorwiegend in der Oxidationsstufe Fe(III), beispielsweise als schwer lösliches Eisenhydroxid ($\text{Fe(OH)}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) oder Goethit (FeOOH) vor. Bei physiologisch relevantem pH befindet sich so nur eine Konzentration von etwa $10^{-15} - 10^{-18} \text{ M Fe(III)}$ in Lösung [Bagg und Neilands (1987), Kim und Guerinot (2007)], was deutlich unter den Bedürfnissen von Pflanzen ($10^{-4} - 10^{-8} \text{ M}$) liegt [Hell und Stephan (2003), Fox und Guerinot (1998)]. Eisen ist in der Lage, oktaedrische Komplexe mit unterschiedlichen Liganden zu formen und besitzt in Abhängigkeit vom Liganden ein variables Redoxpotential [Marschner (1995)]. Daher eignet es sich besonders als Elektronenüberträger in den Elektronen-Transfer-Reaktionen [Hell und Stephan (2003)].

Unter den an Redox-Reaktionen beteiligten, Eisen enthaltenden Proteinen unterscheidet man im wesentlichen zwischen Häm-Proteinen und Eisen-Schwefel Proteinen. Die bekanntesten Vertreter der Häm-Proteine sind neben dem Hämoglobin die Cytochrome,

die in Chloroplasten und Mitochondrien direkt an den Elektronen-Transfer Reaktionen beteiligt sind. Aber auch Katalase und Peroxidase sind Häm-Gruppen enthaltende Enzyme. Auch Eisen-Schwefel-Proteine vom 2Fe–2S Typ und 4Fe–4S Typ sind an den Elektronen-Transfer-Reaktionen in Chloroplasten und Mitochondrien beteiligt. Der bekannteste Vertreter der Eisen-Schwefel-Proteine ist jedoch das u. a. auch an der Photosynthese beteiligte Ferredoxin. Weitere bekannte Vertreter sind die Superoxid-Dismutase (SOD, Überführung von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2) und die Aconitase (Citrat-Zyklus) [Marschner (1995)].

1.1.1.2 Toxizität

Zweifelsohne profitiert eine Vielzahl von biologischen Prozessen von den chemischen Eigenschaften des Eisens als Übergangsmetall. Dennoch birgt gerade diese Eigenschaft des Eisens eine große Gefahr in sich, nämlich wenn Eisen als freies Ion vorliegt:



In der so genannten Fenton-Reaktion [Fenton (1894), Hell und Stephan (2003)] katalysiert Fe^{3+} die Formierung von hoch reaktiven Hydroxyl-Radikalen ($OH\cdot$), die ihrerseits unspezifisch mit Biomolekülen reagieren. Die vielfältigen, durch derartige ROS (reactive oxygen species) verursachten Schädigungen umfassen u. a. die Peroxidation von Membranlipiden und die Oxidation von Disulfidbrücken in Proteinen [Himmelblau und Amasino (2000), Valko et al. (2005)].

1.1.1.3 Die Folgen von Eisenmangel bei Pflanzen

Der offensichtlichste Phänotyp des Eisenmangels bei Pflanzen ist die Eisenmangel-Chlorose, bei der durch niedrigere Chlorophyllgehalte des Blattes dieses eine gelbliche Färbung annimmt. Dieser Effekt wird u. a. dadurch erklärt, dass die Synthese von δ -Aminolaevulinat (ALA) als Vorstufe des Chlorophylls und des Häms direkt abhängig von der Eisenversorgung ist [Marschner (1995)]. Ein weiterer Effekt des Eisenmangels ist eine drastische Verkleinerung der Chloroplasten, wohingegen Blattwachstum und Zellzahl kaum beeinträchtigt sind. Neben der Eisenabhängigkeit der Chlorophyllbiosynthese erklärt sich dieser Effekt auch durch die Präsenz von eisenabhängigen Proteinen in den Photosystemen I und II. Unter Eisenmangel sind sowohl die Licht- als auch die Dunkelreaktion und konsequenterweise auch der Stärkegehalt der Chloroplasten stark eingeschränkt.

Der Effekt des Eisenmangels auf den Wurzelphänotyp höherer Pflanzen ist unterschiedlich, wobei das primäre Ziel jeweils die Erhöhung der Eisenaufnahmekapazität ist. Alle Pflanzen mit Ausnahme der Gramineen reagieren mit vermindertem Wurzelwachstum

und gleichzeitiger Anpassung der Anatomie an das Bedürfnis, mehr Eisen aus der Rhizosphäre aufzunehmen. Der Querschnitt der apikalen Wurzelzone vergrößert sich, die Wurzelhaarbildung ist deutlich induziert und es formieren sich vermehrt Transfer-Zellen, deren Ausstülpungen der Zellwand zu einer deutlichen Oberflächenvergrößerung der Wurzel beitragen. Im Gegensatz dazu zeigen Gramineen keinen typischen Eisenmangel-Phänotyp der Wurzel [Marschner (1995)]. Dieser Unterschied ist in den beiden unterschiedlichen Strategien der Eisenaufnahme in diesen beiden Pflanzengruppen begründet, die ausführlich in Abschnitt 1.2.1 erläutert werden.

1.1.1.4 Eisenmangel in der menschlichen Ernährung - physiologische und ökonomische Aspekte

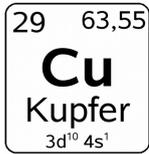
Die ausreichende Versorgung mit Eisen spielt in der menschlichen Ernährung eine besonders wichtige Rolle, da die Leistungsfähigkeit des Organismus von einer ausreichenden Sauerstoffversorgung sowie einer gut funktionierenden Atmungskette besonders abhängig ist. In der Tat ist der laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) 4–5 Milliarden Menschen betreffende, ernährungsbedingte Eisenmangel die am häufigsten anzutreffende Mangelerkrankung weltweit, die im Gegensatz zu den meisten anderen Mangelerkrankungen auch in den Industrienationen weite Verbreitung findet [WHO (2001)]. Da Eisen auch als Kofaktor beispielsweise der Mobilisierung von Retinol (Vitamin A) in der Leber oder der Synthese von Thyroxin eine wichtige Rolle spielt, sind auch die ausreichende Versorgung mit Vitamin A und Iod direkt von der Eisenversorgung abhängig [WHO (2006)].

Die weitaus schwerwiegendere Konsequenz des Eisenmangels stellt aber die so genannte Eisenmangel-Anämie dar, bei der durch chronische Unterversorgung mit Eisen die Bildung von Hämoglobin drastisch beeinträchtigt ist. Von weltweit 2 Milliarden an Anämie leidenden Menschen sind laut Schätzungen der WHO 600-700 Millionen Fälle mehr oder weniger eindeutig auf mangelhafte Eisenversorgung zurück zu führen [WHO (2004b)]. Dennoch spielt Eisenmangel auch bei anderen Formen der Anämie, beispielsweise Infektionskrankheiten wie Malaria, Tuberkulose oder HIV/AIDS, eine wichtige Rolle, da die eingeschränkte Fähigkeit zur Blutbildung vor dem Hintergrund des krankheitsbedingten Blutverlusts nur eine schleppende Genesung ermöglicht.

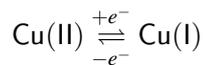
Die ökonomischen Einbußen durch mangelnde Eisenversorgung der Bevölkerung werden auf bis zu 20 % geschätzt. Demzufolge ist es eines der erklärten Ziele der WHO, den ernährungsbedingten Eisenmangel als eine der Ursachen von Anämien zu bekämpfen. Vielfältige Studien zeigen, dass die Leistungsfähigkeit von anämischen Patienten durch Ergänzung der Nahrung mit Eisen um 10-30 % erhöht werden kann [WHO (2001)]. Ein wichtiger in diesem Zusammenhang zu nennender Aspekt ist die Generierung von transgenen Kulturpflanzen, die durch erhöhte Eisenaufnahme und -deponierung in den Früchten eine Perspektive zur lokalen Prävention der Eisenmangelanämie darstellen könnten (vgl. Abschnitt 1.4 / S. 33).

1.1.2 Kupfer

1.1.2.1 Chemische Eigenschaften und biologische Bedeutung



Der Kupferanteil in der Erdkruste wird mit ca. 0,006 % angegeben, wobei Kupfer sowohl als Erz also auch in metallischer Form vorkommen kann. Sprosse von höheren Pflanzen enthalten etwa 6 mg Cu kg^{-1} Trockenmasse [Marschner (1995)]. Ähnlich dem Eisen kann Kupfer in zwei unterschiedlichen Oxidationsstufen, Cu(I) und Cu(II), vorliegen:



Kupfer besitzt eine hohe Affinität zu Peptid- und Sulfhydrylgruppen (cysteinreiche Proteine) auf der einen und zu Carboxyl- und Phenolgruppen auf der anderen Seite. Daher liegt Kupfer sowohl intrazellulär als auch im Boden zu mehr als 98 % in komplexierter Form vor [Marschner (1995)].

Durch seine Redox Aktivität eignet sich Kupfer ebenso wie Eisen zur Katalyse von Redox-Reaktionen und ist an den Elektronen-Transfer-Reaktionen der Photosynthese (Plastocyanin) und Respiration (Cytochrom-c-Oxidase) beteiligt. Darüber hinaus spielt Kupfer eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des Ethylen (Co-Faktor von Ethylenrezeptoren), Lignifizierung der Zellwand (apoplastische Oxidasen) und dem Schutz vor oxidativem Stress (CuZn-Superoxid-Dismutase) [Marschner (1995), Rodríguez et al. (1999), Pilon et al. (2006), Puig et al. (2007)].

1.1.2.2 Toxizität

Ähnlich dem Eisen ist auch im Fall des Kupfers dessen Redox-Aktivität gleichzeitig die Ursache für die Toxizität frei vorliegender Kupfer-Ionen. Analog der Fenton-Reaktion können freie Kupferionen die Bildung von schädlichen Hydroxyl-Radikalen ($\text{OH}\cdot$) herbeiführen. Darüber hinaus kann eine übermäßige Versorgung mit Kupfer bei Pflanzen auch indirekt Eisenmangel auslösen [Marschner (1995)].

1.1.2.3 Die Folgen von Kupfermangel bei Pflanzen

Mangelnde Versorgung mit Kupfer verursacht eine Chlorose v. a. in jungen Blättern. Dieser Effekt geht einher mit einer Auflösung der intergranulären Lamellen und einem Anschwellen der Grana in den Chloroplasten. Diese Symptome sind typische Indikatoren von oxidativem Stress und sind v. a. auf einen Verlust der Aktivität der CuZn-Superoxid Dismutase in den Chloroplasten zurück zu führen. Ein weiteres typisches, durch Kupfermangel induziertes, anatomisches Merkmal ist eine Beeinträchtigung der Lignifizierung der Zellwände insbesondere im Sklerenchym. Dabei sind vorwiegend generative

Gewebe, insbesondere die Pollenentwicklung, betroffen, was sich in einer Verminderung des Ertrags bei Kulturpflanzen auswirkt. Oft induziert Kupfermangel auch eine Nekrose des Apikalmeristems, wodurch in Folge der Aufhebung der Apikaldominanz die Zahl der Seitentriebe zunimmt [Marschner (1995)].

1.1.2.4 Die Bedeutung von Kupfer in der Physiologie des Menschen

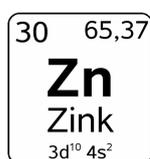
Die Wichtigkeit der Aufnahme von Kupfer für die menschliche Ernährung wurde v. a. durch die Untersuchung zweier genetisch bedingter Stoffwechselerkrankungen aufgeklärt. Sowohl beim X-chromosomal vererbten Menkes-Syndrom als auch beim autosomal vererbten Morbus-Wilson-Syndrom ist die Funktion von für den Kupfertransport maßgeblich verantwortlichen P-Typ ATPasen mit gegensätzlichen Auswirkungen auf den Kupferhaushalt gestört.

Die Aufnahme von Kupfer aus der Nahrung erfolgt im Dünndarm. Die P-Typ ATPase ATP7A ist u. a. verantwortlich für den Transport des Kupfers aus dem Dünndarmepithel in die Blutbahn und für den Kupfertransport über die Blut-Hirn-Schranke. Beim Menkes-Syndrom sind diese Transportwege des Kupfers weitestgehend unterbrochen. Dadurch wird eine Kupfermangelsituation hervorgerufen, die zu vielfältigen Entwicklungsstörungen, insbesondere des Gehirns, bis hin zur Lethalität führen kann [Mercer (2001)].

Durch die Fehlfunktion der für das Morbus-Wilson-Syndrom verantwortlichen P-Typ ATPase ATP7B wird die Ausscheidung von Kupfer über die Galle verhindert. Dies führt zu einer toxischen Anreicherung des Kupfers v. a. in der Leber aber auch in anderen Organen wie dem zentralen Nervensystem, die unbehandelt zum Tod des Patienten führt [Mercer (2001)].

1.1.3 Zink

1.1.3.1 Chemische Eigenschaften und biologische Bedeutung



Das Vorkommen von Zink in der Erdkruste wird mit ca. 0,02% angegeben, wobei Zink stets als Erz und nie in elementarer, metallischer Form vorliegt. Sprosse von höheren Pflanzen enthalten etwa 20 mg Zn kg^{-1} Trockenmasse [Marschner (1995)]. Im Gegensatz zu Eisen und Kupfer besitzt Zn ein voll besetztes *d*-Orbital, wodurch es keine Redox-Aktivität besitzt, sondern ausschließlich in der Oxidationsstufe +II vorliegt. Darüber hinaus fungiert Zn^{2+} als Lewis-Säure, wodurch es sowohl stabile als auch labile Ligandenverbindungen eingehen kann. Die physiologische Bedeutsamkeit von Zink liegt in der Eigenschaft des Zn^{2+} , stabile nicht-kovalente Bindungen mit den Seitenketten von Aminosäuren (v.a. Cystein, Histidin und Glutaminsäure) einzugehen und damit die Ausbildung von physiologisch wichtigen Proteinstrukturen zu ermöglichen [Berg und Shi (1996)].

Zn²⁺ spielt eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von DNA bindenden Domänen (Zn-Finger, Zn-Cluster und RING Finger) in transkriptionellen Regulatoren. Des Weiteren ist Zink als Bestandteil von mehr als 300 Enzymen (z. B. Alkalische-Phosphatase, Alkohol-Dehydrogenase, CuZn-Superoxid Dismutase) an vielfältigen Stoffwechselwegen beteiligt [Fox und Guerinot (1998)].

1.1.3.2 Toxizität

Die molekularen Mechanismen der Toxizität von Zn²⁺, die sich beispielsweise in der Inhibition von Schlüsselenzymen (z. B. GAPDH), Einleitung der Apoptose und fehlerhafter Proteinfaltung äußert [Sheline et al. (2000), Wätjen et al. (2002)], sind im einzelnen nicht näher bekannt. Es ist allerdings nahe liegend, dass die strukturgebende Affinität von Zn²⁺ zu bestimmten Aminosäuren in Proteinen bei Zn-Überschuss durch unspezifische Bindungen auch negative Auswirkungen auf Proteinstrukturen haben und damit z. B. Enzyminhibitionen zur Folge haben kann.

Bei Pflanzen ist ein Überangebot an Zink oft mit der Ausbildung von Chlorosen verbunden, die wiederum das Resultat von durch Zink-Stress induziertem Mangel an anderen Metallen sein können [Marschner (1995)]. Beispielsweise ist der für die Eisenaufnahme aus dem Boden hauptsächlich verantwortliche Fe²⁺-Transporter IRT1 in *Arabidopsis thaliana* auch in der Lage, Zn²⁺ zu transportieren [Korshunova et al. (1999)], weshalb die Fe²⁺-Aufnahme bei einem Überangebot von Zn²⁺ beeinträchtigt sein kann. Durch die Verdrängung des Mangans in der Thylakoidmembran durch Zink wird mit der Photolyse des Wassers ein wesentlicher Schritt der Photosynthese inhibiert. Auch kann die pH-abhängige Aktivität der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCO) durch Zink-Stress induziertem Mangel an Magnesium stark beeinträchtigt sein [Marschner (1995)].

1.1.3.3 Die Folgen von Zinkmangel bei Pflanzen

Durch seine vielfältigen Funktionen, insbesondere in Transkriptionsfaktoren, sind die Auswirkungen von Zinkmangel bei Pflanzen in der Regel nicht auf eine einzelne beeinträchtigte Funktion zurück zu führen. Das deutlichste Merkmal von unter Zinkmangel wachsenden Pflanzen ist ein vermindertes Größenwachstum in Folge der Verkürzung der Internodien sowie eine Verkleinerung der Blattspreiten [Marschner (1995)]. Diese auf eine Fehlfunktion von Pflanzenhormonen hindeutenden Effekte korrelieren in der Tat mit einer Verminderung der Konzentration der Pflanzenhormone Auxin und Gibberellinsäure [Cakmak et al. (1989), Sekimoto et al. (1997)].

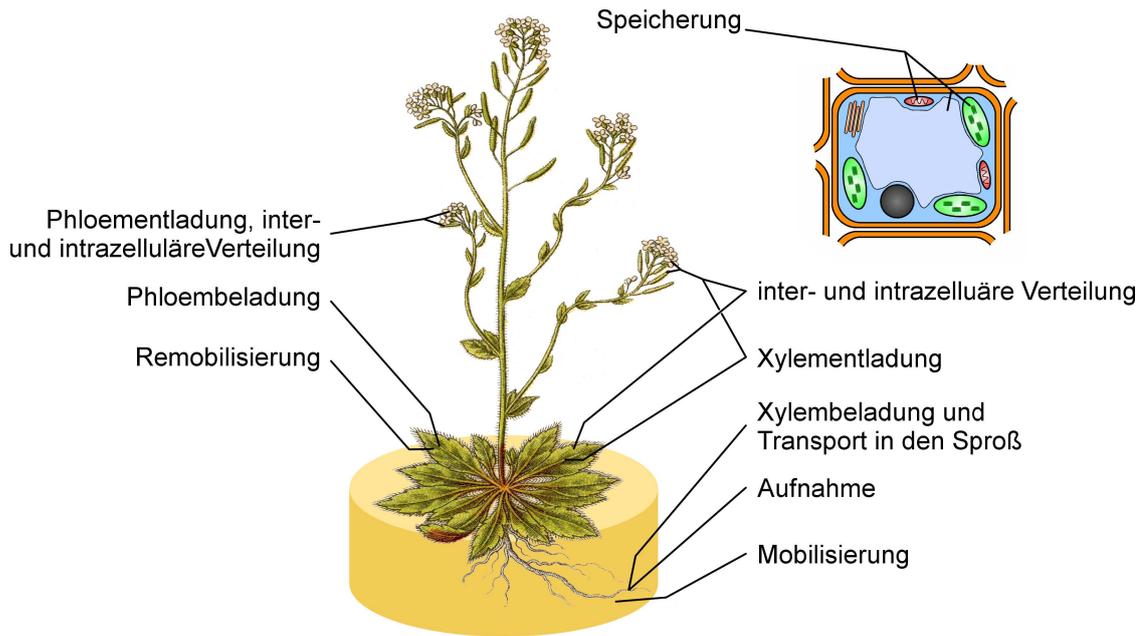


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Elemente des Metallhomöostase Netzwerks in höheren Pflanzen am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* (Zeichnung aus [Sturm und Sturm (1796)]).

1.2 Die Homöostase des Metallhaushalts höherer Pflanzen

Die gegensätzlichen Bedürfnisse von Organismen, auf der einen Seite mit den physiologisch essentiellen Metallen versorgt und auf der anderen Seite vor deren potentieller Toxizität geschützt zu sein, machen eine strenge Regulation der Metallhomöostase notwendig. Dies gilt insbesondere für Pflanzen, die als sessile Organismen ungünstigen Umweltbedingungen nicht durch Änderung ihres Standorts begegnen können.

Das komplexe Netzwerk der Metallhomöostase höherer Pflanzen umfasst die folgenden Teilprozesse (vgl. Abbildung 1.2):

1. Mobilisierung und Aufnahme
2. Bindung durch Chelatoren
3. Interzelluläre Verteilung in der Pflanze
 - a) radialer Transport in der Wurzel
 - b) Beladung des Xylems und Transport in den Sproß
 - c) Entladung des Xylems und interzelluläre Verteilung
4. Intrazelluläre Verteilung und Speicherung
5. Remobilisierung und Translokation über das Phloem

In der Folge werden die einzelnen Komponenten der Metallhomöostase mit Schwerpunkt auf die Homöostase des Eisens, als die in Pflanzen am besten untersuchte Metallhomöostase, näher erläutert. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass die Homöostase eines

einzelnen Metalls keinesfalls isoliert zu betrachten ist. Vielmehr handelt es sich um ein Netzwerk von Komponenten, die oftmals auch mehrere Metalle gleichzeitig adressieren, so dass Ungleichgewichte in der Homöostase eines Metalls durchaus auch Auswirkung auf die Homöostase anderer Metalle haben können.

1.2.1 Mobilisierung und Aufnahme

Die Mobilisierung von Metallionen beschreibt den Umstand, dass die benötigten Metalle im Boden zum Teil zwar vorhanden, aber unter bestimmten Umständen nicht ohne weiteres verfügbar sind. Die Wichtigkeit dieses Aspekts variiert mit den physiko-chemischen Eigenschaften sowie dem Bedarf der Pflanze an den jeweiligen Metallen. Durch seine hohe Affinität zu organischen Gruppen liegt Kupfer beispielsweise zu mehr als 98 % in komplexierter und damit relativ leicht verfügbarer Form vor [Marschner (1995)]. Dem gegenüber liegt in gut belüfteten Böden bei neutralem pH nur ein Bruchteil des benötigten Eisens frei in Lösung vor, während der Großteil als unlösliches Eisenhydroxid für Pflanzen nicht verfügbar ist. Einzig in anaeroben Böden bei gleichzeitig niedrigem pH, wie sie typischerweise in den gefluteten Reisfeldern Japans vorkommen, liegt Eisen in größerer Menge auch in reduzierter und damit leicht löslicher Form vor.

Die Überwindung des Defizits zwischen Eisenbedarf ($10^{-4} - 10^{-8}$ M) [Fox und Guerinot (1998), Hell und Stephan (2003)] und Eisenverfügbarkeit ($10^{-15} - 10^{-18}$ M) [Bagg und Neilands (1987)] erfolgt bei höheren Pflanzen durch zwei unterschiedliche Strategien zur Mobilisierung des Eisens. Dabei wird die Löslichkeit des Eisens entweder durch Ansäuerung des Bodens (Strategie I) oder durch Ausscheidung von Chelatoren (Strategie II) in nötigem Maße erhöht und damit die Aufnahme von Eisen in ausreichenden Mengen ermöglicht [Römheld und Marschner (1986)].

1.2.1.1 Strategie I der Eisenaufnahme

Alle Pflanzen mit Ausnahme der Gräser (Gramineen) nutzen die Strategie I der Eisenaufnahme [Römheld und Marschner (1986)], die aus drei Komponenten besteht: Ansäuerung des Bodens, Reduzierung von Fe^{3+} zu Fe^{2+} und Transport von Fe^{2+} in die Wurzel (vgl. Abbildung 1.3a). Der am besten untersuchte Vertreter unter den Strategie I Pflanzen ist der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, an dessen Beispiel die Strategie I der Eisenaufnahme in der Folge im Detail erläutert werden soll.

Ansäuerung

Durch die Ansäuerung der Rhizosphäre wird die Löslichkeit von Fe^{3+} aus Eisenhydroxiden um das 1000fache erhöht [Schwertmann (1991), Kim und Guerinot (2007)]. Die für die Protonenausscheidung verantwortliche H^+ -ATPase wurde auf molekularer Ebene bislang nicht identifiziert. Allerdings wird die Genfamilie der AHA P-Typ ATPasen [Palmgren

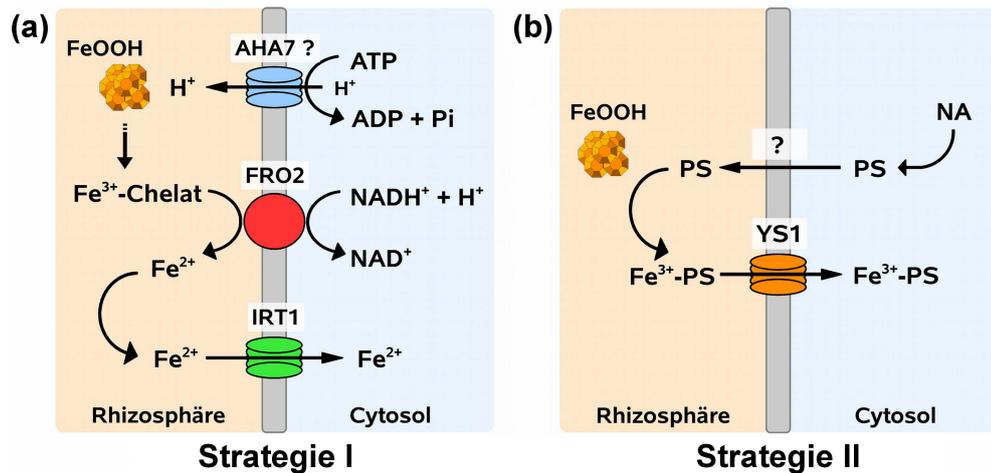


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Strategien I und II der Eisenaufnahme durch höhere Pflanzen. Die Mobilisierung von Eisen aus unlöslichen Eisen(III)-verbindungen ($\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ und FeOOH) beruht bei der Strategie I ((a), höhere Pflanzen mit Ausnahme der Gramineen) auf der Ansäuerung der Rhizosphäre durch aktive Protonenausscheidung, vermutlich durch die P-Typ ATPase AHA7. Nach der Reduzierung von Fe(III) zu Fe(II) (FRO2) wird dieses in die Wurzel transportiert (IRT1). Im Gegensatz zu Strategie I beruht die Eisenmobilisierung bei der Strategie II ((b), nur Gramineen) auf der Chelatierung von Fe(III) durch in die Rhizosphäre ausgeschiedene Phytosiderophore (PS). PS-Fe(III)-Chelate werden aktiv in die Wurzel transportiert (YS1). Benannt sind jeweils die an den Strategien beteiligten Komponenten aus *A. thaliana* (Strategie I) und *Z. mays* (Strategie II).

(2001)] in *Arabidopsis thaliana* mit dieser Funktion in Verbindung gebracht. Besonders AHA7 scheint in dieser Hinsicht ein viel versprechender Kandidat zu sein, da dieses Gen in einer Microarray Studie als mögliches Ziel des bislang einzigen bekannten, eindeutig die Eisenaufnahme regulierenden Transkriptionsfaktors FIT identifiziert wurde [Colangelo und Gueriot (2004)].

Reduzierung des Eisens

Das in *Arabidopsis thaliana* hauptsächlich für die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} zum Zweck der Eisenaufnahme aus dem Boden verantwortliche Gen ist FRO2 (Ferric Reduction Oxidase2). In der Mutante *frd1*, die aus einem Screen nach Fe(III)-Chelat-Reduktase defizienten EMS-Mutanten hervorging, ist FRO2 defekt [Yi und Gueriot (1996), Robinson et al. (1999)]. Die Unfähigkeit, unter Eisenmangelbedingungen Fe^{3+} zu reduzieren, führte in *frd1* zu deutlichen Symptomen des Eisenmangels wie z. B. einer Eisenmangelchlorose. Umgekehrt konnte durch die Überexprimierung von FRO2 (*pCaMV-35S::FRO2*) in *Arabidopsis* eine erhöhte Toleranz gegenüber Eisenmangel [Connolly et al. (2003)] bzw. die Komplementierung des *frd1* Phänotyps erreicht werden [Kim und Gueriot (2007)]. FRO2 ist vornehmlich in der Rhizodermis von eisendefizienten Wurzeln exprimiert, was eine Funktion in der Eisenaufnahme wahrscheinlich erscheinen lässt [Connolly et al. (2003)]. FRO2 ist Mitglied einer Genfamilie mit insgesamt acht Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana*, die von zwei Arbeitsgruppen im Detail untersucht wurde [Wu et al. (2005), Mukher-

jee et al. (2006)]. Trotz teils gegensätzlicher Ergebnisse, lässt sich festhalten, dass die Mitglieder der *FRO* Genfamilie überwiegend durch das Angebot an Fe reguliert und zudem stark gewebespezifisch exprimiert sind. Da diese Gewebespezifität nicht auf die Wurzel beschränkt ist, sondern insbesondere auch vaskuläre Gewebe in den Blättern einschließt, kann von einer über die Eisenaufnahme in der Wurzel hinaus gehende Bedeutsamkeit der Reduktion von Eisen ausgegangen werden, die beispielsweise auch die Entladung des Xylems betreffen könnte.

Weitere durch Eisenmangel induzierbare Fe(III)-Chelat-Reduktasen sind für Tomate (*Solanum esculentum*, vormals *Lycopersicon esculentum*: *SeFRO1* [Li et al. (2004)]) und Erbse (*Pisum sativum*: *PsFRO1* [Waters et al. (2002)]) beschrieben.

Transport von Fe^{2+} in die Wurzel

Die Aufnahme von Fe^{2+} erfolgt über den Transporter IRT1, einem Mitglied der 15 Mitglieder umfassenden ZIP (ZRT, IRT-like proteins) Familie in *Arabidopsis thaliana*. Identifiziert wurde *IRT1* in einem Hefekomplementationsexperiment, in dem der Wachstumsdefekt der Hefemutante *fet3fet4* bei geringem Eisenangebot durch Transformation mit Plasmiden einer cDNA Bank aus *Arabidopsis thaliana* aufzuheben versucht wurde [Eide et al. (1996)]. In weiteren Hefekomplementations Experimenten konnte gezeigt werden, dass IRT1 neben Eisen auch Mangan und Zink transportieren kann und dass die Transportaktivität von IRT1 durch andere Schwermetalle wie Kupfer und Cadmium inhibiert werden kann [Korshunova et al. (1999)].

Die entsprechende Mutante *irt1* in *Arabidopsis* zeigte eine schwere Chlorose, stark vermindertes Wachstum und war unfruchtbar. Durch Besprühen mit größeren Mengen gelöstem Eisen konnte der Phänotyp jedoch abgemildert und die Bildung von Samen induziert werden [Henriques et al. (2002), Varotto et al. (2002), Vert et al. (2002)].

Orthologe zu *IRT1* sind weiter für Tomate (*SeIRT1* und *SeIRT2* [Bereczky et al. (2003)]) und Erbse (*RIT1* [Cohen et al. (2004)]) beschrieben. Interessanterweise besitzt auch Reis (*Oryza sativa*), obwohl zu den Gramineen gehörig und damit eine Strategie II Pflanze, zwei zu *IRT1* orthologe Gene (*OsIRT1* und *OsIRT2*), die zudem unter Eisenmangelbedingungen induziert sind [Bughio et al. (2002), Ishimaru et al. (2006)]. Erklären lässt sich das, angesichts einer fehlenden durch Eisenmangel induzierbaren Reduktase, mit einer vermutlichen Standortanpassung des Reis an zeitweilig geflutete Habitate. Unter solchen teils anaeroben Bedingungen verschiebt sich das Redox-Gleichgewicht des Eisens zum Fe^{2+} hin, welches als zusätzliche Eisenquelle direkt durch *OsIRT1* und *OsIRT2* aufgenommen werden könnte.

1.2.1.2 Strategie II der Eisenaufnahme

Die Strategie II der Eisenmobilisierung und -aufnahme ist bei allen Gräsern (Gramineen) anzutreffen, darunter wichtige Kulturpflanzen wie Reis (*Oryza sativa*), Gerste (*Hordeum vulgare*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Mais (*Zea mays*). Das Prinzip der Eisenmobilisierung beruht hier auf der Chelatierung von Fe(III) durch in die Rhizosphäre ausgeschiedene Phytosiderophore (PS), nicht-proteinogene Aminosäuren mit hoher Bindungsaffinität zu Fe, und der Aufnahme als Fe(III)-PS Chelat in die Wurzel (siehe Abbildung 1.3b auf Seite 10).

Bereits in den 1970er Jahren wurden in Wurzelwaschungen von Reis- und Haferpflanzen Fraktionen von Chelatoren mit hoher Affinität zu Fe(III) isoliert [Takagi (1976)] und später der erste bekannte Vertreter der Phytosiderophore, die Mugininsäure (MA)¹, aus Gerste isoliert [Takemoto et al. (1978)] und charakterisiert [Sugiura et al. (1981)]. In der Folge wurde die Ausscheidung der Phytosiderophore als Strategie der Gramineen zur Eisenmobilisierung postuliert [Römheld und Marschner (1986)], die möglicherweise über vesikulären Transport stattfindet [Negishi et al. (2002)]. Auch wurde der Syntheseweg der zu der Familie der Mugininsäuren gehörenden Phytosiderophore weitestgehend aufgeklärt und die daran beteiligten Gene kloniert [u. a. Mori (1999), Nakanishi et al. (2000), Bashir et al. (2006)].

Der Vorläufer der Synthese aller Mugininsäuren ist das in allen Strategie I und Strategie II Pflanzen vorkommende Nicotianamin (NA), das als zentrales Molekül dieser Arbeit in Abschnitt 1.3 im Detail besprochen wird. Die Synthese von NA wird durch die Nicotianamin Synthase (NAS) in einem einzigen enzymatischen Schritt katalysiert. Das Substrat der NAS ist S-Adenosyl-Methionin (SAM), das u. a. auch eine direkte Vorstufe in der Synthese des Pflanzenhormons Ethylen ist [Adams und Yang (1979), Roje (2006)]. Die Synthese eines Moleküls NA benötigt drei Moleküle SAM und beinhaltet zwei Carboxypropyl-Gruppen Transfers und die Formierung eines Azetidinrings (siehe Abbildung 1.4). Das für die Gramineen spezifische Enzym Nicotianamin-Aminotransferase (NAAT) konvertiert NA zum 3''-Keto-Intermediat, das anschließend zu 2'-Deoxymugininsäure (DMA) reduziert wird. DMA stellt den am weitesten verbreiteten Vertreter und gleichzeitig den Ausgangspunkt zur Synthese aller weiteren PS dar, auf die in diesem Zusammenhang nicht im Detail eingegangen werden soll.

Die Synthese der PS ist v. a. unter Eisenmangel aber auch unter Zinkmangel induziert [Tolay et al. (2001)], wobei die artspezifische Menge und Zusammensetzung der in die Rhizosphäre ausgeschiedenen PS direkt mit der Ausprägung der artspezifischen Toleranz von Eisenmangelbedingungen korreliert [Marschner (1995)]. So scheiden beispielsweise Reis, Weizen und Mais hauptsächlich DMA in relativ geringen Mengen aus, während Gerste neben DMA u. a. auch MA, HMA und epiHMA (vgl. Abbildung 1.4) in größeren Mengen ausscheidet und wahrscheinlich auch deshalb widerstandsfähiger gegenüber Eisenmangelbedingungen ist (Bashir et al. (2006), Kim und Guerinot (2007)).

¹ abgeleitet von japanisch „oo-mugi“ = Gerste [Hell und Stephan (2003)].

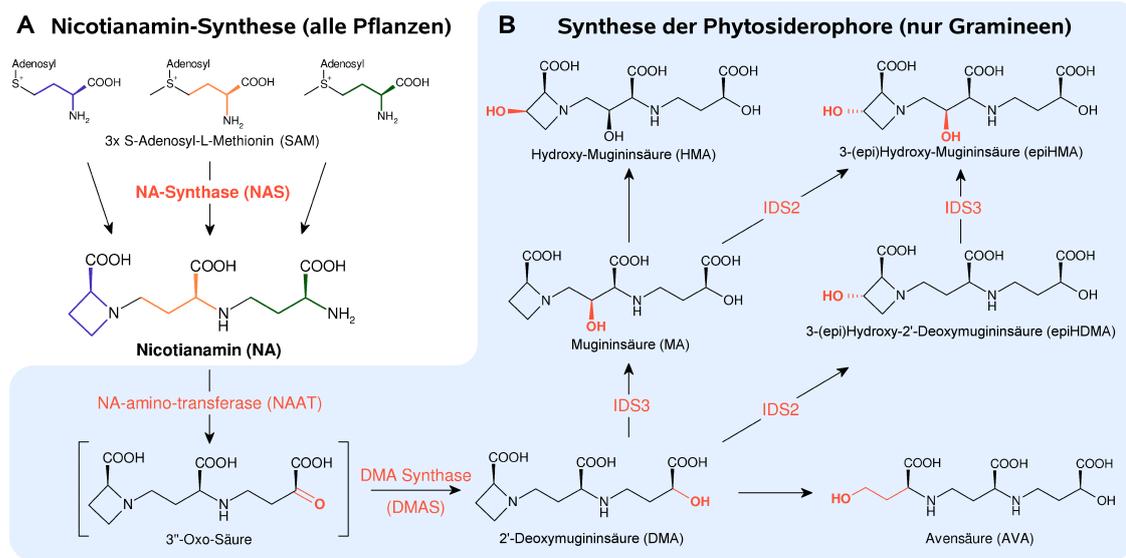


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Syntheseweges von Nicotianamin und den Phytosiderophoren der Klasse der Mugininsäuren (modifiziert nach [Nakanishi et al. (2000), Bashir et al. (2006)]). (a) Syntheseweg des Nicotianamin. Die aus den jeweiligen SAM-Molekülen stammenden Abschnitte im NA sind jeweils in der gleichen Farbe hervorgehoben [Roje (2006)]. (b) Syntheseweg der Phytosiderophore. Durch die Desaminierung des Nicotianamins entsteht der Vorläufer aller Phytosiderophore, 2-Deoxymugininsäure. Je nach Organismus variiert die Zahl der zusätzlich synthetisierten Varianten der Phytosiderophore. Rote Pfeilbeschriftung = Name des jeweiligen Enzyms, rote Seitengruppen = Modifikationen am jeweiligen Molekül.

Der Transport von Fe(III)-PS Chelat in die Wurzel wurde an der in den späten 1920er Jahren isolierten Maismutante *yellow stripe 1* (*ys1*, [Beadle (1929)]) aufgeklärt. Der Phänotyp dieser Mutante, auffallend gelbe Längsstreifen zwischen den Leitbündeln, wurde aufgrund der Ähnlichkeit zu eisen- und mangandefizienten Maispflanzen mit einer Störung der Eisenassimilation in Verbindung gebracht [Bell et al. (1958), Bell et al. (1962)] und schließlich ein Defekt in der Aufnahme von Fe(III)-PS Komplexen als Ursache identifiziert [von Wirén et al. (1994)]. Über Ac Transposon Tagging wurde das in *ys1* defekte Gen, *YELLOW STRIPE 1* (*ZmYS1*) identifiziert, das ein 682 Aminosäuren langes integrales Membranprotein mit 12 Transmembrandomänen kodiert und zur Familie der Oligopeptidtransporter (OPT) gezählt wird. Durch Komplementierungsstudien in der Hefemutante *fet3fet4* konnte ein Transport von Fe(III)-DMA, nicht jedoch Fe(III)-Citrat, durch *YS1* nachgewiesen werden [Curie et al. (2001)]. Weitere elektrophysiologische Studien an *Xenopus* Oozyten bestätigten eine Protonen-gekoppelte Transportaktivität von *YS1*. In weiteren Hefekomplementationsstudien wurde ein breites Substratspektrum von *ZmYS1* beobachtet, das neben dem Transport von Fe(III)-DMA auch DMA-Chelate mit Zn(II), Cu(II), Mn(II) Cd(II), Fe(III)-MA sowie insbesondere auch Ni(II)-NA, Fe(II)-NA und Fe(III)-NA umfasste [Roberts et al. (2004), Schaaf et al. (2004), Murata et al. (2006)].

ZmYS1 ist Teil einer Genfamilie, die basierend auf ESTs mindestens 3 Mitglieder in Mais umfasst [Curie et al. (2001)]. In Reis umfasst die Familie der *YELLOW STRIPE LIKE* Gene dagegen 18 Mitglieder (*OsYSL1 – OsYSL18* [Koike et al. (2004)]) während von der gegenüber Eisenmangel besonders toleranten Gerste bislang nur ein einzelnes Ortholog

zu *YS1* aus Mais, *HvYS1*, bekannt ist [Murata et al. (2006)]². Interessanterweise unterscheiden sich *ZmYS1* und *HvYS1* trotz hochgradiger Konservierung der Aminosäuresequenz deutlich in ihrer Substratspezifität. Während *ZmYS1* ein breites Substratspektrum hat (s. o.), übt *HvYS1* eine für Fe(III)-MA hoch spezifische Transportaktivität aus, eine Eigenschaft, die unter Eisenmangelbedingungen zu einer deutlich höheren Effektivität in der Eisenaufnahme führt [Murata et al. (2006)]. In jüngsten Untersuchungen an chimären *ZmYS1* und *HvYS1* Proteinen konnte gezeigt werden, dass die Substratspezifität durch eine nur 20 Aminosäuren umfassende Peptidsequenz im extrazellulären Loop zwischen den Transmembrandomänen VI und VII bestimmt wird [Harada et al. (2007)]. In Bezug auf die Empfindlichkeit von Mais gegenüber Eisenmangelbedingen eröffnet diese Erkenntnis die Möglichkeit eines neuen transgenen Ansatzes zur Anpassung von Mais an weniger optimale Anbaugelände.

1.2.2 Bindung von Metallen durch Chelatoren

Unmittelbar nach dem Eintritt von aufgenommenen Metallionen in den Symplasten ergibt sich die Notwendigkeit der Komplexbildung der Metallionen durch Chaperone und Chelatoren [Clemens (2001)]. Diese Komplexbildung freier Metallionen dient zum einen dem Schutz der Pflanzenzelle vor oxidativen Schäden, wie sie beispielsweise durch die Fenton Reaktion hervorgerufen werden können. Aber auch die geringe Löslichkeit v. a. des Eisens erfordert eine Komplexbildung, da ungebundene Fe Ionen vermutlich als unlösliches FeOOH präzipitieren würden. In den Arbeiten von Rae et al. (1999) und Outten und O'Halloran (2001) an den Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* konnten trotz zellulärer Metallkonzentrationen im millimolaren Bereich jeweils nur femtomolare (10^{-15} M) Konzentrationen an freien Cu^{2+} und Zn^{2+} Ionen detektiert werden. Das daraus errechnete Vorkommen von weniger als einem einzelnen freien Metallion pro Zelle verdeutlicht die Perfektion, mit der Zellen vor freien Metallionen geschützt werden.

Chaperone gewährleisten vornehmlich den zielgerichteten Transport von Metallionen zu den Zielproteinen. Chelatoren dienen hingegen vornehmlich der Pufferung von funktionell ungebundenen Metallionen [Clemens (2001)] und sind vermutlich auch die Transportform von Metallionen im intra- und interzellulären Transport der Metallionen. Die Chelatierung von Metallionen ist daher von zentraler Bedeutung für die Metallhomöostase insgesamt. Mit Ausnahme von Nicotianamin, das gesondert im Abschnitt 1.3 behandelt wird, werden in der Folge die wichtigsten Gruppen pflanzlicher Chelatoren beispielhaft vorgestellt.

²Die Genome von Gerste und Mais sind noch nicht vollständig sequenziert. Die genannten Zahlen stellen daher nur den derzeitigen Wissensstand dar. Rückschlüsse auf die tatsächliche Situation in den einzelnen Genomen können daraus nicht gezogen werden.

Metallothioneine

Metallothioneine (MT) sind eine Gruppe niedermolekularer Proteine mit einem Cystein-gehalt von ca. 30%. In speziellen Metall-Schwefel Clustern können 4-12 Metallatome gebunden werden [Hamer (1986)]. MT werden entsprechend der Anordnung der Cysteine in drei Klassen (I – III) eingeteilt. Die Funktion der MT ist v. a. an der in Säugern überwiegenden Klasse I untersucht worden, die hauptsächlich Zn^{2+} bindet und mit der cytosolischen Pufferung von Zn^{2+} in Verbindung gebracht wird. Eine untergeordnete Rolle spielen MT in Säugern auch in der Homöostase von Cu^{2+} sowie der Toleranz gegenüber Cd^{2+} [Masters et al. (1994)]. In *Saccharomyces cerevisiae* überwiegen MT der Klasse II, die an der Cu-Homöostase beteiligt sind. Auch das erste aus Pflanzen isolierte MT, E_c -Protein genannt, gehört zur Klasse II der MT. E_c bindet vornehmlich Zn^{2+} und wurde aus Embryonen des Weizen isoliert [Lane et al. (1987)]. In *Arabidopsis thaliana* bilden MT1A-C, MT2A-B und MT3 die Familie der Metallothioneine, die v.a. mit der cytosolischen Pufferung von Cu^{2+} und Cd^{2+} in Verbindung gebracht werden [Clemens (2001)].

Phytochelatine

Phytochelatine (PC) sind v. a. in Bindung und Detoxifizierung von nicht-essentielle Schwermetallen involviert. Die Synthese von PC durch Transpeptidierung reduzierten Gluthathions zu $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$) wird bei einsetzendem Metallstress binnen weniger Minuten induziert. Besonders gut untersucht ist die Detoxifizierung von Cd^{2+} , das in Form niedermolekularer PC-Cd Komplex in die Vakuole geschleust und dort unter Einlagerung von S^{2-} in hoch molekularen Komplexen eingelagert wird. Neben Cd wurden auch PC-Komplexe mit Ag, Cu und As identifiziert [Clemens (2001)].

organische Säuren und Aminosäuren

Die Eigenschaft von Metallionen, in Proteinen stabile Bindungen mit Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffatomen einzugehen, prädestiniert auch niedermolekulare organische Säuren und Aminosäuren als potentielle Liganden. In natürlich vorkommenden Metall hyperakkumulierenden Pflanzenspezies (z. B. *Arabidopsis halleri*, *Thlaspi caerulescens* und *Alyssum lesbiacum*) geht die erhöhte Toleranz gegenüber Schwermetallionen häufig einher mit einer Erhöhung der Konzentration an organischen Säuren wie Citrat, Malat und Oxalat, sowie der Aminosäure Histidin [Clemens (2001), Haydon und Cobbett (2007)].

Die Wirkungsweise von organischen Säuren in Bezug auf die Schwermetalltoleranz sind vielfältig. So wurden Komplexe von Zn, Cd und Ni mit Citrat und Histidin vornehmlich in Vakuolen des Zn, Cd und Ni Hyperakkumulators *T. caerulescens* lokalisiert [Krämer et al. (2000), Ma et al. (2005)]. Dem gegenüber gilt die Ausscheidung von Citrat und Malat in die Rhizosphäre als Antwort einiger Pflanzen auf erhöhte Konzentrationen von Aluminium (Al) [Delhaize und Ryan (1995)].

Neben der cytosolischen Pufferung von Schwermetallen wird Citrat die Funktion als wahrscheinlicher Ligand von Eisen im Xylem zugesprochen [Tiffin (1966), White (1981b)]. Durch Computer Simulationen sowie Messungen mittels Kapillar-Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass unter den Bedingungen im Xylem, insbesondere pH 5,5, Fe(III)-Citrat gegenüber Fe(II)-NA und Fe(III)-NA dominiert [von Wirén et al. (1999)]. Diese These wird v. a. auch durch jüngere Arbeiten an der *frd3* Mutante bestätigt (vgl. Abschnitt 1.2.3)

1.2.3 Interzelluläre Verteilung der Metallionen in der Pflanze

Der Aspekt der interzellulären Verteilung von Metallionen in der Metallhomöostase umfasst den Langstreckentransport der Metallionen in der Pflanze. Der Transport aus der Rhizosphäre in den Symplasten der Wurzel sowie die Be- und Entladung des Xylems stellen dabei jeweils Übergänge der Metallionen aus dem Apoplasten in den Symplasten (Aufnahme in die Rhizodermis, Entladung des Xylems) und umgekehrt (Beladung des Xylems) dar. Die Regulation von Transportproteinen, die die bei diesen Übergängen zwischen Apoplasten und Symplasten zwingend notwendige Überwindung der Plasmamembranen selektiv kontrollieren, sind vor diesem Hintergrund für die Regulation der Metallverteilung von zentraler Bedeutung. In der Folge werden die einzelnen Aspekte des Langstreckentransports der Metallionen aus der Wurzel in den Sproß im Detail näher erläutert.

1.2.3.1 radialer Transport und Beladung des Xylems

Nach der aktiven Aufnahme der Metallionen in den Symplasten der Wurzel werden diese vermutlich zunächst radial über den Symplasten zu den Leitgefäßen transportiert. Im Fall des möglichen Fe(II)-NA Chelats mit einer Molmasse von nur 356, erfolgt der Transport vermutlich passiv entlang des Konzentrationsgradienten über die zahlreichen Plasmodesmata der Wurzelzellen [Hell und Stephan (2003)]. Da dieser Transport in der NA freien Tomatenmutante *chloronerva* (vgl. Abschnitt 1.3.1) jedoch uneingeschränkt funktioniert, ist auch der Transport in Form eines anderen Fe Chelats denkbar. Der Transport von Fe(II)-NA oder eines andere Fe-Chelats in das Xylem stellt eine Möglichkeit zur Regulation der Fe Verteilung dar. Im Fall des Fe(II)-NA Chelats obliegt dieser Transport vermutlich Mitgliedern der YSL (yellow-stripe1-like) Familie. Diese zu ZmYS1 ähnlichen Transporter werden in Abschnitt 1.3.5 in direktem Zusammenhang mit NA besprochen.

Unter den Bedingungen des Xylems (pH 5,5) wird NA *in vitro* als Chelator des Eisens durch Zugabe von Citrat verdrängt [von Wirén et al. (1999)]. Durch Autooxidation ändert sich zudem die Oxidationsstufe von Fe(II) zu Fe(III). Die Bedeutung von Citrat im Transport von Eisen im Xylem belegen auch Untersuchungen an der *Arabidopsis* Mutante *frd3*. Ursprünglich wurde *frd3* in dem gleichen Screen wie *frd1* (vgl. S. 10) identifiziert, zeichnete sich aber im Gegensatz zu *frd1* durch konstitutiv induzierte Strategie I der

Eisenaufnahme aus [Yi und Guerinot (1996)]. Das FRD3 Protein ist v.a. im Perizykel und im vaskulären Zylinder der Wurzel lokalisiert [Green und Rogers (2004)] und ist ein Transmembrantransporter der MATE (multidrug and toxin efflux) Familie, deren Mitglieder kleine organischen Moleküle transportieren. Der Phänotyp der *frd3* Mutante, eine für Eisenmangel typische Blattchlorose, verringerte Eisengehalte im Sproß bei gleichzeitig erhöhter Eisenkonzentration in der Wurzel, deutet auf eine wichtige Funktion des FRD3 Substrats in der Translokation des Eisens von der Wurzel in den Sproß hin. In jüngsten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der charakteristische Phänotyp der *frd3* Mutante bei Anzucht auf Citrat haltigem Medium normalisiert wird. Weiter konnte der Transport von Citrat durch FRD3 Protein in *Xenopus* Oocyten demonstriert werden, wodurch eine Rolle des Citrats sowohl als Substrat von FRD3 als auch als wichtiger Ligand des Eisens im Xylem sehr wahrscheinlich ist [Durrett et al. (2007)].

1.2.3.2 Entladung des Xylems, Beladung des Phloems und interzelluläre Verteilung

Die Entnahme von Eisen aus dem Xylem und damit die erneute, kontrollierte Aufnahme in den Symplasten ist weitgehend ungeklärt. Es wird aber davon ausgegangen, dass nicht Fe(III), sondern reduziertes Fe(II) in die Zelle aufgenommen wird. Die Reduktion des Eisens könnte zum einen analog zur Eisenaufnahme in den Wurzeln über eine Eisenreduktase erfolgen. Reduktase Aktivität von *PsFRO1* in Blättern der Erbse [Waters et al. (2002)] sowie die Lokalisierung des *P^{AtFRO8}::GUS* Konstrukts in den Leitbündeln von Blättern in *Arabidopsis* [Wu et al. (2005)] bestärken diese Annahme. Eine weitere in Betracht zu ziehende Möglichkeit der Reduktion bildet eine lichtabhängige Photoreduktion des Fe(III)-Citrats [Bienfait und Scheffers (1992)]. Möglicherweise spielen aber auch beide Möglichkeiten parallel eine Rolle in der Reduktion des Fe(III).

Aus dem Xylem entladenes Eisen gelangt vermutlich als Fe(II)-NA Chelat über den symplastischen Transport in das Zielgewebe. Aber auch ein direkter Transport von Fe(II)-NA über Transferzellen in das Phloem ist, wie die Lokalisierung eines *P^{OsYSL2}::GUS* Konstrukts vermuten lässt, möglich [Koike et al. (2004)]. Für den Transport von Fe im Phloem kommen neben NA möglicherweise auch Fe bindende Proteine wie z. B. das aus dem Phloemsaft von *Ricinus communis* isolierte, 11 kDa großen ITP (Iron Transport Protein) in Frage. Neben der Bindung von $^{55}\text{Fe}^{3+}$ *in vivo* und *in vitro* konnte ITP *in vitro* auch Cu^{2+} , Zn^{2+} und Mn^{2+} binden [Krüger et al. (2002)]. Die Entladung des Phloems ist weitgehend ungeklärt. Allerdings lässt insbesondere der Phänotyp von jungen Blättern der NA-defizienten Tomatenmutante *chloronerva* eine Beteiligung von NA vermuten (vgl. Abschnitt 1.3.1).

1.2.4 Intrazelluläre Verteilung und Speicherung

Neben der Regulation der interzellulären Verteilung spielt auch die intrazelluläre Verteilung der Metallionen eine wichtige Rolle in der Metallhomöostase. Der Transport von Metallionen in die einzelnen Kompartimente der Pflanzenzelle, insbesondere Chloroplasten, Mitochondrien, Golgi und Vakuole, hängt auch hier entscheidend von der Regulation von integralen Membrantransportern ab. Neben der Wahrnehmung der physiologischen Funktionen bieten Zellen aber auch einen wirksamen Schutz vor Schwankungen im Angebot an essentiellen Metallen am Standort der Pflanze. Durch Einlagerung von überschüssigen Metallionen in die Vakuole, oder z. B. auch in Form von Fe-Ferritin in den Chloroplasten, werden intrazelluläre Speicher an Metallionen geschaffen, die bei Bedarf remobilisiert werden können. Eine temporäre Mangelsituation, wie sie beispielsweise kurz nach der Auskeimung auftritt, kann auf diese Weise überbrückt werden. Neben der Speicherung von essentiellen Metallionen dient die Vakuole aber auch als Depot für aufgenommene, nicht-essentielle Metallionen und damit der Detoxifizierung des Cytosols.

Ein Großteil des Wissens über den gerichteten Transport von Metallionen zu den Syntheseorten von Metalloproteinen stammt aus der Erforschung der Cu Homöostase in Hefe und Säugern. So interagiert das Hefe-Analogon der für das Menke-Syndrom verantwortliche P-Typ ATPase CCC2 (vgl. Abschnitt 1.1.2.4/S. 6) spezifisch mit dem cytoplasmatischen Kupferchaperon ATX1 und vermittelt den gezielten Transport von Kupfer aus dem Cytoplasma in den Golgiapparat [Puig und Thiele (2002)]. Homologe zu CCC2 und ATX1 (*RAN1* und *CCH*) wurden auch im Genom von *Arabidopsis* identifiziert und sind u. a. für die Versorgung von Ethylenrezeptoren (z. B. ETR1) verantwortlich, die als Homodimere ein Kupfer Ion umschließen und deren Reifung vermutlich im Post-Golgi stattfindet [Himmelblau und Amasino (2000)]. *RAN1* gehört zur Superfamilie der Schwermetall transportierenden P_{1B}-ATPasen (HMA = heavy-metal-transporting P-type ATPases), die in *Arabidopsis* aus acht Mitgliedern besteht (HMA1 – HMA8) und ein breites Substratspektrum (Cu, Zn, Cd, Pb, Co und Ag) abdeckt. Neben dem Golgi (HMA7 = *RAN1*) sind bislang nur die Chloroplasten (HMA1, HMA6 und HMA8) als Wirkungsort von HMA identifiziert worden [Colangelo und Guerinot (2006)].

Eine weitere Familie von intrazellulären Metalltransportern stellen die CDF (cation diffusion facilitator) Proteine dar, die über Protonen-Antiport Metallionen aus dem Cytoplasma hinaus transportieren. Das bislang einzige gut untersuchte Mitglied ist MTP1 (metal tolerance protein 1, vormals ZAT1), das in der Membran der Vakuole lokalisiert ist und Zn-Ionen transportiert [Desbrosses-Fonrouge et al. (2005)]. Interessanterweise enthält das Genom des Zn/Cd Hyperakkumulators *Arabidopsis halleri* gleich 3 differenziell regulierte *MTP1* Homologe, von denen zudem 2 Gene in einer Rückkreuzung mit dem Nicht-Hyperakkumulator *Arabidopsis lyrata* mit der erhöhten Zn-Toleranz co-segregieren [Dräger et al. (2004)]. Eine direkte Funktion von MTP1 in der Zn-Toleranz durch die Einlagerung von Zn in die Vakuole ist daher nahe liegend.

In der intrazellulären Speicherung von Eisen spielt v. a. Phytoferritin eine zentrale Rolle. Phytoferritin ist ein multimeres Protein, das sich aus 24 homo- und heterologen Untereinheiten zusammensetzt und in seinem Inneren bis zu 4000 Eisenmoleküle in löslicher und damit verfügbarer Form aufnehmen kann [Hell und Stephan (2003)]. Phytoferritine akkumulieren bei Fe Überschuss hauptsächlich in Plastiden, sind aber unter normalen Wachstumsbedingungen in grünen und damit Photosynthese betreibenden Chloroplasten nur in geringen Mengen detektierbar [Briat et al. (1999)]. Phytoferritine sind insbesondere in jungen, sich entwickelnden Geweben mit hohem Fe Bedarf sowie in Samen vorzufinden, wo am Beispiel von *Pisum sativum* 92 % des enthaltenen Fe an Phytoferritin gebunden ist. Darüber hinaus spielt Phytoferritin auch eine wichtige Rolle im Schutz vor der Toxizität des Eisens sowie oxidativen Stress im allgemeinen [Briat et al. (1999), Deák et al. (1999), Van Wuytswinkel et al. (1999)].

Ort der Speicherung von Eisen in Samen von *A. thaliana* sind vornehmlich die provaskulären Stränge des Hypocotyls, des Radicels sowie der Cotyledonen des Embryos. Studien an VIT1 in *Arabidopsis*, einem Ortholog des in Hefe für die Speicherung von Eisen in der Vakuole verantwortlichen Transporters CCC1, zeigten, dass VIT1 essentiell für eine korrekte Verteilung von Eisen in *Arabidopsis* Samen ist. Da zudem $P^{VIT1}::GFP$ spezifisch im Tonoplast lokalisiert war, wurde eine vakuoläre Speicherung des Eisens in den provaskulären Strängen des Embryos postuliert [Kim et al. (2006)].

1.2.5 Remobilisierung und Translokation

Bei einsetzender Unterversorgung oder erhöhtem Bedarf an Metallionen im Zuge der Pflanzenentwicklung, wie sie beispielsweise bei einsetzender reproduktiver Entwicklung auftritt, können in der Zelle gespeicherte Metallionen auch remobilisiert und in bedürftige Gewebe transportiert werden. In der Eisenhomöostase sind zwei redundant wirkende Transporter der NRAMP (natural resistance associated macrophage protein) Familie beschrieben, die die in der Entwicklung des Keimlings wichtige Remobilisierung von in der Vakuole gespeichertem Eisen vermitteln [Lanquar et al. (2005)]. Die NRAMP Genfamilie in *A. thaliana* umfasst insgesamt 6 Mitglieder, von denen zumindest NRAMP1 an der Eisenhomöostase beteiligt zu sein scheint, da es Eisen transport in der *fet3fet4* Hefemutante vermitteln konnte und zudem *in planta* durch Eisenmangel induziert war. [Curie et al. (2000), Thomine et al. (2000)].

Die Remobilisierung von Metallionen spielt besonders im reproduktiven Wachstum eine wichtige Rolle. Die Konzentrierung der Nährstoffversorgung auf reproduktive Organe kann zu einer partiellen Unterversorgung der Wurzel mit dem Energieträger Saccharose und somit zu einer verminderten Aufnahmekapazität durch die Wurzel führen. In vegetativen Pflanzenorganen gespeicherte Nährstoffe werden in diesem Entwicklungsstadium verstärkt mobilisiert und über den Symplastischen Transport in das Phloem geladen. Die Remobilisierung einiger Metallionen, insbesondere Zn und Cu, wird mit der Einleitung der Blattseneszenz in Verbindung gebracht [Marschner (1995)]. Der Anteil remobilisierten

Eisens am Gesamtgehalt des Samens von *P. sativum* wird in der Literatur mit 20–30 % angegeben [Hocking und Pate (1977), Grusak (1994)].

1.2.6 Die Regulation der Metall Homöostase

Die vielfältigen Elemente der Metall Homöostase benötigen eine auf die Bedürfnisse der Pflanze fein abgestimmte Regulation, die bislang v. a. an den Elementen der Eisenaufnahme untersucht wurde und daher an diesem Beispiel näher erläutert wird. Dennoch sei darauf hingewiesen, dass auch die Regulation der Eisenaufnahme bislang nur fragmentiert verstanden ist.

Die Expression von Genen der Eisenhomöostase variiert mit der Güte der Eisenversorgung, so dass die Transkription von Genen der Eisenaufnahme, z.B. *IRT1* und *FRO2*, unter Fe Mangel induziert und unter Fe Überschuss reprimiert werden. Andere Gene widerum, z.B. Ferritin, sind entsprechend ihrer Funktion in der Eisenhomöostase entgegengesetzt reguliert.

1.2.6.1 Promotorelemente

Die Regulation der Genexpression erfolgt in erster Linie über das Zusammenspiel von *cis*-Elementen der Promotoren mit Transkriptionsfaktoren, die im Fall der Fe Homöostase zu einer Induktion oder Reprimierung der Genexpression führen kann. Beispielsweise bewirkt das zwischen *Z. mays* und *A. thaliana* konservierte, 16 bp lange *cis*-Element IDRS (iron-dependent regulatory sequence) jeweils die Reprimierung der Expression von Ferritin Genen unter Fe Mangel [Petit et al. (2001)]. Unter Fe Mangel induzierende *cis*-Elemente stellen im Gegensatz dazu z. B. *IDE1* und *IDE2* (iron deficiency responsive elements) aus Gerste dar. Diese *cis*-Elemente wurden aus dem Promotor des ein Enzym der Phytosiderophorsynthese kodierenden *IDS2* Gens isoliert und erwiesen sich in Promotor Deletionsstudien als jeweils essentiell für die Induzierung der *IDS2* Expression unter Fe Mangel [Kobayashi et al. (2003)].

Die Induktion der Genexpression des BHLH Transkriptionsfaktors *OsIRO2* unter Fe Mangel ist möglicherweise auf ein IDE ähnliches *cis* element im Promotor zurück zu führen. Interessanterweise wurde ein weiteres, für die Bindung von *OsIRO2* essentielles Element (5'-ACGTGG-3') u. a. in den Promotoren von *OsNAS1*, *OsNAS3*, *OsIRT1* und *OsIDS3* von Reis vorgefunden und scheint für die Fe abhängige Regulation dieser Gene verantwortlich zu sein [Ogo et al. (2006)].

Allerdings kann die Expression von Genen der Metallhomöostase auch global, beispielsweise durch Phytohormone, reguliert sein. Einen möglichen Hinweis darauf bietet beispielsweise die Beschreibung eines ERE (ethylen responsive element) ähnlichen Elements im Promotor von *AtNAS3*, einem Nicotianamin Synthase kodierenden Gen aus *A. thaliana* (vgl. Abschnitt 1.3.4), das dem zufolge möglicherweise auch durch das Phytohormon Ethylen reguliert sein könnte [Suzuki et al. (2001)].

1.2.6.2 Transkriptionsfaktoren

Die bislang einzigen eindeutig identifizierten Transkriptionsfaktoren der Fe Homöostase in dicotylen Pflanzen sind die BHLH Transkriptionsfaktoren *SeFER* aus Tomate sowie dessen Ortholog *FIT* aus *A. thaliana*. Das *SeFER* Gen wurde 2002 aus einer Anfang der 1970er Jahre beschriebenen Mutante, T3238fe [Brown et al. (1971)], isoliert und kloniert [Ling et al. (2002)]. In dieser Mutante ist die Regulation der Fe Aufnahme in dem Sinne gestört, dass die Elemente der Strategie I der Eisenaufnahme nicht induzierbar sind. Das wurzelspezifisch exprimierte *SeFER* Gen kodiert ein zu der Gruppe der BHLH (basic helix loop helix) Transkriptionsfaktoren zählendes Protein und zeigt eine durch Fe Mangel induzierbare, zellspezifische Expression in der Rhizodermis sowie im Zentralzylinder [Ling et al. (2002)]. Entsprechend der physiologischen Störung sind in *SeFER* die Gene *SeFRO1* und *SeIRT1*, aber auch *SeNRAMP1* kaum exprimiert [Bereczky et al. (2003), Li et al. (2004)]. Die ektopische Expression von *SeFER* unter Kontrolle des CaMV-35S Promotors in Tomate ergab erwartungsgemäß eine Akkumulation von *FER* mRNA auch bei ausreichender Fe Versorgung. Im Gegensatz dazu bewirkte das *PCaMV-35S::SeFER* Konstrukt jedoch keine konstitutive Akkumulation an *FER* Protein, das wie in Wild Typ nur bei Fe Mangel detektierbar war. Dieses Ergebnis wurde mit einer vom tatsächlichen Fe Status der Pflanze abhängigen, post-transkriptionellen Kontrolle des *FER* Proteins begründet [Brumbarova und Bauer (2005)].

Das Ortholog zu *SeFER* in *A. thaliana* ist *FIT* (= fer-like iron deficiency induced transcription factor)³ und wurde parallel in einem Microarray und aufgrund einer hohen Ähnlichkeit der Gensequenz zu *SeFER* identifiziert [Colangelo und Guerinot (2004), Jakoby et al. (2004)]. Ähnlich *SeFER* wird *FIT* unter Fe Mangel in der Rhizodermis sowie dem Zentralzylinder der Wurzel exprimiert und kolokalisiert damit mit der Expression der Fe Aufnahme Markergene *FRO2* und *IRT1*. Die ohne Fe Supplementation kleinwüchsigen, stark chlorotischen sowie lethalen *fit* Mutanten zeigen eine Deregulation einer Reihe von Genen der Metallhomöostase, die im Fall von *IRT1* jedoch kontrovers diskutiert wird. Während in *fit-3* kein *IRT1* Transkript detektiert werden konnte [Jakoby et al. (2004)], konnte in der Mutante *fit1* *IRT1* Transkript nachgewiesen werden [Colangelo und Guerinot (2004)]. Im Gegensatz zu *fit-3*, dessen T-DNA Insertion sich im ersten Exon von *FIT* befindet, ist der Leserahmen in *fit1* jedoch nicht unterbrochen. Stattdessen befindet sich die T-DNA Insertion in *fit-1* 103 bp vor dem Startcodon im 5'-UTR, wodurch ein vollständiges *FIT* Transkript zumindest in geringer Dosis möglich erscheint. Trotz der Promotor Insertion in *fit-1* konnten in Microarray Studien eine Reihe von deregulierten Elementen der Metallhomöostase identifiziert werden. Neben der die Strategie I der Eisenaufnahme repräsentierenden Gene *AHA7* und *IRT1* war u. a. auch die Expression intrazellulärer Transporter wie *HMA3* und *NRAMP1*, sowie auch die Synthese von Chelatoren in Form von *NAS1* und einer putativen Phytochelatin Synthetase in *fit-1* verändert [Colangelo und Guerinot (2004)]. Ob diese Deregulation eine direkte Folge des *FIT* Mangels oder indirekt

³*FIT* war ursprünglich uneinheitlich benannt: FRU, FIT1, und BHLH029. Die Einigung auf den Namen *FIT* erfolgte im Sommer 2006 durch P. Bauer, M.L. Guerinot und H.-Q. Ling [Wang et al. (2007)]

durch die drastische Änderung des Fe Status ausgelöst wurde, ist dabei allerdings nicht geklärt. Im Gegensatz zu $P^{2xCaMV-35S}::SeFER$ exprimierenden Tomatenpflanzen führte die analoge Überexpression von $P^{2xCaMV-35S}::FIT$ in *A. thaliana* zu einer Akkumulation von *IRT1* und *FRO2* Transkript unter Fe Mangel auch in Blättern der transgenen Pflanzen. Bei ausreichender Fe Versorgung waren Transkripte von *IRT1* und *FRO2* jedoch weder in Blättern noch in Wurzeln detektierbar, was auf eine Kontrolle der Genexpression durch den Fe Status hinweist [Jakoby et al. (2004)]. Es wäre interessant zu klären, ob diese Fe abhängige Regulation von *IRT1* und *FRO2* in Abhängigkeit von FIT Protein erfolgt, das analog zu SeFER einer post-transkriptionellen Regulation unterworfen sein könnte.

Das Genom von *A. thaliana* birgt vier weitere, unter Fe Mangel induzierte Gene, die BHLH Transkriptionsfaktoren kodieren. BHLH038, BHLH039, BHLH100 und BHLH101 besitzen Ähnlichkeit zu FIT und werden in die Untergruppe Ib der BHLH Transkriptionsfaktoren eingeordnet. Diese Transkriptionsfaktoren wurden in einem Nebenprojekt zu dieser Arbeit in Kooperation mit Fr. Dr. Hong-Yu Wang bearbeitet, dessen Ergebnis in Wang et al. (2007) publiziert wurde. Einfache knock-out Mutanten dieser Transkriptionsfaktoren zeigten im Gegensatz zu *fit-3* jedoch keinen Phänotyp. Durch die hohe Ähnlichkeit der Gensequenzen dieser BHLH Transkriptionsfaktoren wird davon ausgegangen, dass diese funktionell redundant sein könnten und dass aussagekräftige Resultate erst mit der Generierung von *bhlh* Mehrfachmutanten zu erwarten sind. Die ektopische Expression von *BHLH038* und *BHLH039* in *A. thaliana* führte in den Arbeiten von Vorwieger et al. (2007) auch zu einer Fe unabhängigen Steigerung der Riboflavin Exkretion in Wurzeln und deutet auf eine Funktion dieser beiden BHLH Transkriptionsfaktoren in der Induktion von generellen Stressreaktionen hin.

Interessanterweise wurde mit OsIRO2 (s.o.) ein BHLH Transkriptionsfaktor aus Reis beschrieben, der 32 % bzw. 39 % Identität mit der Aminosäuresequenz von BHLH038 und BHLH039 aufweist und ebenfalls unter Fe Mangel induziert ist. Überexpressions- und RNAi-Experimente zeigten, dass OsIRO2 essentiell für die Regulation der Phytosiderophorsynthese sowie die Fe Aufnahme war [Ogo et al. (2007)]. Mit OsIRO2 wurde damit ein weiterer BHLH Transkriptionsfaktor mit eindeutig essentieller Funktion in der Fe Homöostase identifiziert.

1.2.6.3 Post transkriptionelle Regulation

Über die Regulation der Genexpression hinaus bietet die Regulation von Komponenten der Metallhomöostase auf Proteinebene eine zusätzliche Möglichkeit, schnell und effizient auf Änderungen in der Ernährungssituation zu reagieren. Ein bereits genanntes Beispiel einer solchen Regulation ist die post-transkriptionelle Regulation von SeFER. Auch *IRT1* Protein unterliegt einer post-transkriptionellen Kontrolle, so dass in $P^{CaMV-35S}::IRT1$ Pflanzen, analog zu SeFER, *IRT1* Protein nur unter Fe Mangel detektiert werden konnte [Connolly et al. (2002)]. Eine ähnliche Regulation wurde auch über das ZRT1 (zinc regulated transporter 1) Protein aus Hefe berichtet, bei dem die Proteindegradation über eine

Zn abhängige Ubiquitinierung erfolgte [Gitan et al. (1998), Gitan und Eide (2000)]. Da ZRT1 zu IRT1 eine hohe Ähnlichkeit auf Sequenzebene und darüber hinaus die gleiche Membrantopologie aufweist, ist eine Fe abhängige Ubiquitinierung von IRT1 zumindest denkbar [Connolly et al. (2002)]. Auch FRO2 zeigt eine Regulation auf Proteinebene, die allerdings mangels Antikörper nur indirekt über die Fe abhängige Regulation der Fe Chelat Reduktase Aktivität in *P_{CaMV-35S}::FRO2* Pflanzen beschrieben wurde [Connolly et al. (2003)]. Die in der Literatur beschriebene enge Verknüpfung der transkriptionellen Regulation von *IRT1* und *FRO2* [Vert et al. (2003)] geht nach eigenen Beobachtungen sogar so weit, dass die absoluten Zahlen der Transkriptmengen in cDNA Proben regelmäßig nahezu identisch ist. Es ist daher denkbar, dass analog dazu auch eine koordinierte, post-transkriptionelle Regulation von *IRT1* und *FRO2* existiert, die möglicherweise über den gleichen Mechanismus abläuft.

1.2.6.4 Eisen als regulatorisches Signal

Wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben, spielt der Fe Status der Pflanze eine wichtige Rolle in der Regulation von Elementen der Fe Homöostase. So ist beispielsweise die Induktion der Transkription von *IRT1* und *FRO2* unter Fe Mangel direkt von geringen Mengen an apoplastischem Fe abhängig und unterbleibt vollständig, wenn das apoplastische Fe im Vorfeld entfernt wurde. In split-roots Experimenten wurde das Wurzelsystem von Einzelpflanzen zu gleichen Teilen auf Medium mit –Fe und 100 µM Fe (–/+) aufgeteilt. Neben der Reprimierung von *FRO2* und *IRT1* auf der (–) Seite konnte dabei eine im Vergleich zu Kontrollpflanzen (+/+) deutliche Induktion von *FRO2* und *IRT1* Transkript sowie IRT1 Protein auf der (+) Seite beobachtet werden [Vert et al. (2003)]. Dem zufolge führte der lokale Eisenmangel im –Fe behandelten Teil des Wurzelsystems zu einer Induktion der Eisenmangelantwort in dem Teil des Wurzelsystems, für den Fe verfügbar war. Die Autoren schlossen daraus, dass neben dem lokalen Fe Signal in der Wurzel auch ein im Sproß generiertes, den globalen Fe Status der Pflanze berücksichtigendes Fe Signal Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von *IRT1* und *FRO2* hat. Die Existenz eines im Sproß generierten, die Fe Aufnahme kontrollierenden Signals wurde zuvor auch aufgrund von Pfropfungsexperimenten mit der *dgl* Mutante aus *P. sativum* postuliert, in der das Signal aufgrund der im Sproß wirkenden Mutation gestört ist [Grusak und Pezeshgi (1996)].

Auch die Intensität der Expression des Transkriptionsfaktor *FIT* hängt sowohl von einem lokalen als auch einem systemischen Fe Signal ab. Mit Hilfe einer *P^{FIT}::GUS* Reporterlinie wurde die GUS Aktivität als Maß für die Intensität der *FIT*-Transkription gesetzt und in einem split-root System ähnlich wie oben beschrieben getestet. Erwartungsgemäß war die GUS Aktivität von (–/–) Kontrollpflanzen hoch und die von (+/+) Kontrollpflanzen niedrig. Beide Hälften eines auf (–/+) ausgelegten Wurzelsystems zeigten jedoch eine in etwa gleich große, im Vergleich zu den Kontrollsituationen intermediäre GUS Aktivität [Wang (2006), Wang et al. (2007)]. Dem zufolge wurde die aufgrund des lokalen Fe Status

entweder hohe oder niedrige Promotoraktivität durch ein unbekanntes systemisches, den globalen Fe Status der Pflanze berücksichtigendes Signal entweder reprimiert (–) oder induziert (+). Weitere Studien zur Identifikation des Signalweges sind erforderlich, um diese Form der Regulation der Eisenaufnahme besser zu verstehen.

1.3 Nicotianamin

Einer der meist beachteten pflanzlichen Chelatoren der letzten Jahre ist die nicht proteino-gene Aminosäure Nicotianamin (NA), deren Rolle als unmittelbare Vorstufe in der Synthese der Phytosiderophore bereits in Abschnitt 1.2.1.2 besprochen wurde. In der Folge soll der Wissensstand über NA und seine physiologische Eigenschaften erläutert werden.

1.3.1 Die Tomatenmutante *chloronerva*

Bereits in den 1960er Jahren wurde die rezessive, semi-lethale Tomatenmutante *chloronerva* als eine im Rahmen von Pfropfversuchen spontan hervorgegangene Mutante isoliert und beschrieben. [Böhme und Scholz (1960)]. Namensgebend ist das charakteristische Hervortreten der grünen Leitbündel v. a. junger Blätter vor dem Hintergrund gelblich-weißer Interkostalfelder (siehe Abbildung 1.5). Im Vergleich zum Wild Typ, der Tomatensorte Bonner Beste (BB), sind die Blätter von *chloronerva* deutlich kleiner und an den Spitzen abgerundet. Weiter zeichnet sich *chloronerva* durch Kleinwüchsigkeit und ein schwach ausgebildetes Wurzelsystem aus, das zudem eine erhöhte Zahl an Seitenwurzeln und Wurzelhaaren sowie verdickte Wurzelspitzen aufweist. Die Bildung der Blüten ist so stark beeinträchtigt, dass diese nur selten auftritt und eine Fruchtbildung stets ausbleibt.

In Pfropfversuchen zwischen $\frac{chl_n}{chl_n}$ und $\frac{BB}{BB}$ (sowie 11 artfremden Solanaceen) konnte sowohl der Phänotyp des Sprosses als auch der Phänotyp der Wurzel partiell normalisiert und normale Blüten-, Frucht- und Samenbildung erreicht werden [Scholz und Böhme (1961)]. Der normalisierende Effekt der Pfropfung nahm aber jeweils mit Einsetzen des reproduktiven Wachstums ab, so dass eine leichte interkostale Chlorose wieder auftrat. Eine partielle Normalisierung des Phänotyps trat auch durch regelmäßiges Besprühen mit Pflanzenextrakten auf [Scholz (1965)].

Der pflanzliche „Normalisierungsfaktor“ wurde erstmals in Form einer wasserlöslichen, hitzestabilen und Ninhydrin positiven Substanz aus *Medicago sativa* (Luzerne) isoliert [Scholz und Rudolph (1968)] und dessen chemische Struktur später als (2S:3'S:3"S)N-[N-(3-Amino-3-Carboxy-propyl)-3-Amino-3-Carboxypropyl]-Azetidin-2-Carboxylsäure = Nicotianamin identifiziert [Kristensen und Larsen (1974), Buděšínský et al. (1980)]. Die Substanz Nicotianamin (NA) erhielt ihren Namen bereits 1971 im Zuge von Studien zum Stickstoffmetabolismus von *Nicotiana tabacum* (Tabak), in denen NA das erste Mal isoliert und beschrieben wurde [Noma et al. (1971)].



Abbildung 1.5: Photographische Darstellung des Phänotyps der Tomatenmutante *chloronerva* im Vergleich zur Wild Typ Sorte Bonner Beste. Neben einer ausgeprägten interkostalen Chlorose in jungen Blättern sind auch chlorotische Flecken an älteren Blättern zu sehen (siehe Vergrößerung). Im Vergleich zum Wild Typ sind die Blätter von *chloronerva* kleiner und abgerundet.

Das Vorkommen von NA erstreckt sich auf alle höheren Pflanzen [Übersicht in Procházka und Scholz (1984)], konnte aber auch in den Pilzen *Basidiobolus meristoporus* [Scholz et al. (1992)] und *Neurospora crassa* [Trampczynska et al. (2006)] sowie einem Bakterienstamm *Streptomyces sp* [Suzuki et al. (1996)] nachgewiesen werden. In Moosen und einzelligen Algen konnte NA hingegen nicht nachgewiesen werden [Procházka und Scholz (1984)]. Auch das Genom des vollständig sequenzierten Moooses *Physcomitrella patens* enthält keinerlei zu einer Nicotianamin Synthese ähnliche Gensequenz (eigene Beobachtung).

1.3.2 Chemische Struktur und Eigenschaften von Nicotianamin

Die Strukturformel sowie die wahrscheinliche 3D-Struktur von NA ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Zur Bildung einer octahedralen Koordinierung besitzt NA sechs funktionelle Gruppen, deren Abstände zudem optimal zur Bildung von Chelaten geeignet sind [Burděšínský et al. (1980)].

Der „Normalisierungsfaktor“ NA wurde ursprünglich als Ligand von Fe(III) und Cu beschrieben [Scholz und Böhme (1980)], die Bindung von Fe(III) konnte aber durch Beneš et al. (1983) nicht bestätigt werden, wohl aber die Bindung von Fe(II) sowie 5 weiteren zweiwertigen Metallen (siehe Tabelle 1.1). Dieses Ergebnis führte zu der allgemeinen

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der Literaturangaben zu Stabilitätskonstanten log K der Bindung von Metallionen durch Nicotianamin.

	Cu(II)	Ni(II)	Co(II)	Zn(II)	Fe(II)	Fe(III)	Mn(II)
Beneš et al. (1983)	18,6	16,1	14,8	14,7	12,1	–	8,8
Anderegg und Ripperger (1989)	–	–	–	15,4	12,8	–	–
von Wirén et al. (1999)	–	–	–	–	–	20,6	–

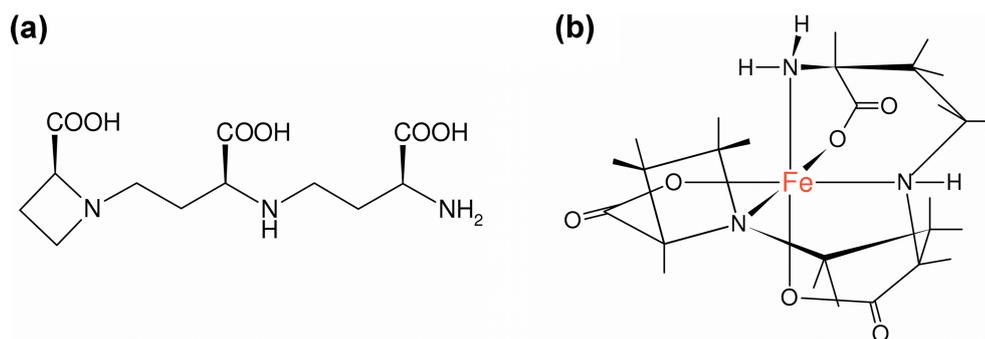
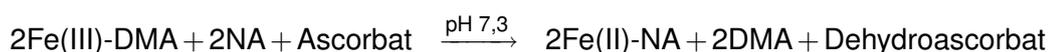


Abbildung 1.6: (a) Strukturformel von Nicotianamin. (b) Wahrscheinliche 3D Struktur des Fe-NA Chelats nach [Buděšínský et al. \(1980\)](#).

Annahme, dass NA nur Fe(II), nicht aber Fe(III), zu binden in der Lage ist. Erst [von Wirén et al. \(1999\)](#) konnten durch die Vermeidung der Bildung von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ in ihrem experimentellen Ansatz die Bildung von Fe(III)-NA nachweisen - mit einer um ca. 10^8 größeren Affinität als Fe(II)-NA. Die Ergebnisse von [von Wirén et al. \(1999\)](#) wurden in der Folge kontrovers diskutiert. Da die Kritik von [Reichman und Parker \(2002\)](#) aber auf rein theoretischen Annahmen beruhte, konnten die Messergebnisse und Interpretationen von [von Wirén et al. \(1999\)](#) nicht grundlegend widerlegt werden [[Hider et al. \(2004\)](#)].

Trotz der um 10^8 größeren Affinität zu Fe(III) ist bei neutralem pH Fe(II) der bevorzugte Bindungspartner von NA. Dieser Umstand wird mit der ungewöhnlich hohen Stabilität und geringen Neigung zur Autooxidation von Fe(II)-NA begründet. Auch besitzt NA im pH Bereich von 6,5 – 9,0 eine ausreichend hohe Chelatierungseffizienz um die Bildung von Fe(III)OH und damit die Präzipitation von Fe zu unterbinden.

Eine mögliche Funktion der hohen Affinität von NA zu Fe(III) wurde in der Entladung von Phytosiderophoren vermutet, da in der Tat NA bei neutralem pH eine deutlich größere Affinität zu Fe(III) besitzt, als das Phytosiderophor DMA [[von Wirén et al. \(1999\)](#)]. Wie jüngere Studien jedoch zeigen, ist NA allein nicht in der Lage, DMA als Chelatierungspartner von Fe(III) zu verdrängen. Allerdings konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass, einhergehend mit einer Ascorbat vermittelten Freisetzung und Reduktion des Fe aus unterschiedlichen Phytosiderophoren (MA, DMA und *epi*-HMA), ein effektiver Transfer des Fe von PS auf NA unter physiologischen Bedingungen möglich ist [[Weber et al. \(2008\)](#)]:



Angesichts üblicherweise ausreichender Ascorbat Konzentrationen in Pflanzenzellen ist ein Ascorbat vermittelter Transfer des Fe von PS auf NA auch *in planta* wahrscheinlich. Neben der Unterbindung der Autooxidation von Fe(II) sowie der Unterbindung der Bildung von unlöslichem Fe(III)OH kann NA dem zufolge eine weitere wesentliche Funktion in der Fe Homöostase zugeschrieben werden.

1.3.3 Der Effekt von Nicotianamin in der Eisen- und Kupferhomöostase

Die genannten Merkmale von *chloronerva*, die Blattchlorose aber auch der Wurzelphänotyp, sind charakteristisch für unter Eisenmangel stehende Pflanzen [Bienfait et al. (1989)]. In der Tat ist in *chloronerva* die Strategie I der Eisenaufnahme, die Protonenausscheidung sowie die Fe-Reduktase Aktivität, auch unter Fe suffizienten Bedingungen konstitutiv induziert [Herbik et al. (1999), Bereczky et al. (2003), Brumbarova und Bauer (2005)]. Die Folge ist eine Akkumulation von Fe v. a. in älteren Blättern [Scholz (1967), Pich et al. (1994)]. In den Blättern selbst kommt es zu einer Fehlverteilung des Fe, eingeschränkt auf die grünen Bereiche nahe der Leitbündel [Scholz (1965)], wo es als unlösliche Fe-Phosphatablagerungen in Chloroplasten des Palisadenparenchyms vorliegt. Ähnliche Ablagerungen wurden auch in Cytoplasma und Vakuole der Rhizodermis beobachtet. Da der Großteil des Fe im Symplasten präzipitiert, schließen die Autoren eine essentielle Beteiligung von NA an der Entladung des Xylems aus [Becker et al. (1992)].

Neben Fe ist auch die Verteilung von Cu direkt von dem Mangel an NA in *chloronerva* betroffen. Cu akkumuliert in der Wurzel, während im Spross Kupfermangel vorherrscht [Pich et al. (1994)]. Dieser Kupfermangel manifestiert sich insbesondere durch die Reduzierung der Zahl an Chloroplasten sowie einer Auflösung der Struktur der Thylakoidlamellen (vgl. Abschnitt 1.1.2.3) [Adler und Scholz (1986)]. Dass nach den Berechnungen von von Wirén et al. (1999) unter den Bedingungen des Xylems sämtliches Cu (sowie 50 % des enthaltenen Zn) als Cu(II)-NA Komplex vorliegt, bestätigt die zuvor vorgeschlagene Funktion des NA im Transport von Cu im Xylem [Pich et al. (1994), Pich und Scholz (1996)].

Die Akkumulation von Metallen in *chloronerva* verstärkt das Risiko der Formierung von ROS. Folglich sind in *chloronerva* die Aktivitäten der dem Schutz vor ROS dienenden, Fe enthaltenen Enzyme Katalase und Ascorbat abhängige Peroxidase um das 3-4fache erhöht [Pich und Scholz (1993), Herbig et al. (1996)]. Im Gegensatz dazu waren kupferhaltige Superoxid Dismutasen (SOD, chloroplastisch und cytosolisch) und auch das Plastocyanin nahezu abwesend [Herbig et al. (1996)]. Die Induktion von Katalase und Peroxidase, beides Fe enthaltende Enzyme, kann daher auch als Kompensation des Verlusts der für den Schutz vor ROS wichtigen Cu enthaltenen SOD interpretiert werden. Sowohl in *chloronerva* als auch in Fe defizienten Wild Typ Pflanzen konnte eine Induktion von u. a. der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und der Formiat-Dehydrogenase (FDH) beobachtet werden, beides Enzyme, von denen bekannt ist, dass sie in Pflanzen bei anaerobischem Stress induziert sind [Herbig et al. (1996)].

1.3.4 Nicotianamin Synthase

Das in *chloronerva* mutierte Gen konnte durch Genkartierung unter Nutzung der Population *chloronerva* × *L. pennellii* zunächst auf den langen Arm von Chromosom I [Ling et al.

AtNAS1	1	MA-CQNNL--VVKQIIDLVDQISKLIKSLKPSKKNVDTLFGLVSTCLPDTDNIDVTNMC-E
AtNAS2	1	MA-CENNL--VVKQIMDLYNQISNLESKPSKKNVDTLFRLVSTCLPDTDNIDVTEIHE
AtNAS3	1	MG-CODEQ--LVQITICDLYEKISKLESKPSSEEDVNILFKQLVSTCIPPNPNIDVTKMC-D
AtNAS4	1	MGYCQDDO--LVNKICDLYEKISKLETLPKCEDVDTLFGLVSTCIPPNPNIDVTKMS-E
SeNAS	1	MVCPNSNP--VVEKVCLELYEQISRLENLSPSKDVNVLFDTDLVHTCMPNP-IDVSKLTC-Q
HvNAS1	1	MDAQNKEVAALTEKTAGTQAATAELPSSLSPSEVDRLFTDLVTACVPPSP-VDVTKLS-P
AtNAS1	57	EVKDMRANLIKLCGEAEGYLEOHFSTILGSLQEDQNPDLHLHIFPYYSNYLKLKLEFDL
AtNAS2	58	KVKDMRSHLIKLCGEAEGYLEOHFSAILGSFED--NPLNHLHIFPYNNYLKLKLEFDL
AtNAS3	57	RVOEIRLNLIKICGAEGLLENHFSSILTSYQD--NPLHHLNIFPYNNYLKLKLEFDL
AtNAS4	58	NIQEMRSNLIKICGAEAEGYLEHHSILTSFED--NPLHHLNIFPYNNYLKLSKLEFDL
SeNAS	57	KIQEIRSHLIKLCGQAEGLSEHSKILSSYEN---PLOHLHIFPYFDNYTKLSLEYNI
HvNAS1	59	EHQORMREALIRLCSAAEGLLEAHYADLLATFDN---PLDHLGLFPYYSNYVNLRSLEYEL
AtNAS1	117	LSQHSS-HVPTKIAFVGSGLPLTSIVLAKFHLNPTTFHNFDDIDSHANTLASNLVSRDSD
AtNAS2	116	LSQHTT-HVPTKVAFVGSGLPLTSIVLAKFHLNPTTFHNFDDIDSHANTLASNLVSRDSD
AtNAS3	115	LEQNLNGFVPKSVAFVGSGLPLTSIVLASFHLKDTIFHNFDDIDPSANSLASLVSSDSD
AtNAS4	116	LEQNLNGFVPRTVAFVGSGLPLTSIVLASFHLKDSIFHNFDDIDPSANMVAARLVSSDSD
SeNAS	114	LTKNTT-NIPKIAFVGSGLPLTSIVLAKHLKTTTFHNYDIDVDANFMASALVAADSD
HvNAS1	116	LARHVPGIAPARVAFVGSGLPLFSSIVLAAHHLPETQFDNYDLCCAANERARKLFGATAD
AtNAS1	176	-LSKRMIFFHTDVLNATEGLDQYDVVFLAALVGMDKESKVKAIIEHLEKHMAGAVMLRS
AtNAS2	175	-LSKRMIFFHTDVLNAKELDQYDVVFLAALVGMDKESKVKAIIEHLEKHMAGAVMLRS
AtNAS3	175	-ISQRMFFHTVDLMDVTESLKGFDDVFLAALVGMNKEEKVKVIEHLQKHMAGAVMLRS
AtNAS4	176	-LSQRMFFHTVDLMDVTESLKGFDDVFLAALVGMDKKKEKVKVVEHLEKHMSPGATMLRS
SeNAS	173	-MSSRMTFFHTADVMDVTCALKDYDVVFLAALVGMDKEDKVKVVDHLAKYMSPGATMLRS
HvNAS1	176	GVGARMSFFHTADVADLTQELGAYDVVFLAALVGMAAEEKAKVIAHLGAHMVEGASLVVRS
AtNAS1	235	AHALRAFLYPIVDSSDLK--GFEVLTIIYHPTDDVNSVVIARKLGGPTT-PGVNG-TRGC
AtNAS2	234	AHGLRAFLYPIVDSCDLK--GFEVLTIIYHPSDDVNSVVIARKLGGSGN-ARGSQ-IGRC
AtNAS3	234	AHGPRAFLYPIVEPCDLO--GFEVLSIYHPTDDVNSVVISKKHPEVSI-GNVGC-PNSC
AtNAS4	235	AHGPRAFLYPIVEPCDLE--GFEVLSVYHPTDEVINSIVISRKLGEDAN-GVVHDHIDQA
SeNAS	232	AHGARAFLYPIVLDPRDLR--GFEVLSVYHPTDEVINSVVIARKLPVPSV-PLLDGLGAYV
HvNAS1	236	AR-PRGFLYPIVDEPDIRRGFEVLAHVHPEGEVINSVIVARKAVEAQLSGPONGDAHAR
		↑ chloronerva: F → S
AtNAS1	291	MFMPNCNSKIHAIMNNRG-KKNMIEEFS-AIE----
AtNAS2	290	VVMPCNCSKVHAILNNRGMEKNLIEEYS-AIE----
AtNAS3	290	LLKPCNCSKTHAKMKN---MMIEEFG-AREEQLS
AtNAS4	292	SDLACNCSKIHVIMNKKK---SIIEEFGAGANEEQLT
SeNAS	289	LPSKCAEIHAFNPLNK--MNLVEEFA--LEE---
HvNAS1	295	GAVPLVSPPCNCFSTKMEASALEKSEELT-AKELAF-

Abbildung 1.7: Vergleich der NAS Aminosäure Sequenzen von *Arabidopsis thaliana*, *Solanum esculentum* und, exemplarisch für NAS Proteine aus Gräsern, HvNAS1 aus *Hordeum vulgare*. Rot gekennzeichnet ist die Aminosäuresubstitution, die in *chloronerva* zum Verlust der NAS Aktivität geführt hat.

(1996)] und in der Folge über RFLP Feinkartierung mittels einer YAC Bibliothek kloniert werden [Ling et al. (1999)]. Das über chromosome walking und Komplementationstudien an transformierten *chloronerva* Pflanzen identifizierte Transkript des *CHLORONERVA* Gens hat eine Länge von 953 bp und kodiert die 35 kDa große Nicotianamin Synthase (NAS, EC 2.5.1.43.). Im Vergleich zu Wild Typ unterscheidet sich das *chloronerva* Allel lediglich in einer Punktmutation (T→C) an Nukleotid-Position 761, die an Position 238 in einem stark konservierten Bereich der Aminosäuresequenz (vgl. Abbildung 1.7) zur Substitution eines Phenylalanins durch Serin geführt hat. Aktivitätsstudien an in *E. coli* exprimierten Transkripten des Wild Typ und des *chloronerva* Allels sowie die Komplementation der *chloronerva* Mutante durch das intakte *CHLORONERVA* Gen bestätigten den Verlust der NAS-Aktivität durch die einzelne Aminosäuresubstitution [Ling et al. (1999)].

Nicotianamin Synthesen wurden erstmals aus Wurzeln Fe defizienter *Hordeum vulgare* (Gerste) isoliert, charakterisiert [Higuchi et al. (1994)] sowie parallel zu *CHLORONERVA*

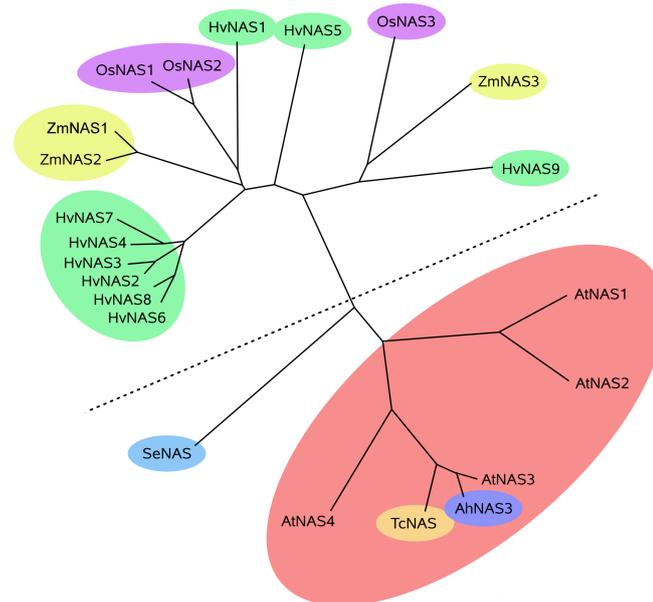


Abbildung 1.8: Phylogenetische Verwandtschaft der bisher annotierten NAS Proteine. Die gestrichelte Linie trennt Strategie I (unten) und Strategie II (oben) Pflanzen. Se = *Solanum esculentum*, Tomate; At = *Arabidopsis thaliana*; Ah = *Arabidopsis halleri*; Tc = *Thlaspi caerulescens*; Hv = *Hordeum vulgare*, Gerste; Os = *Oryza sativa*, Reis; Zm = *Zea mays*, Mais. rot unterlegt = Brassicaceae. Darstellung generiert mit phylip (3.67) auf der Basis von CLUSTALW (2.0) Alignments der Proteinsequenzen.

kloniert [Higuchi et al. (1999), Herbig et al. (1999)]. Gerste enthält insgesamt 9 NAS Gene, während die Genome von *Oryza sativa* (Reis) und *Zea mays* (Mais) jeweils nur 3 NAS Gene enthalten [Inoue et al. (2003), Mizuno et al. (2003)] (vgl. Abbildung 1.8). Im Gegensatz zu Reis gilt Gerste als besonders effizient im Bezug auf die Eisenassimilation, ein Umstand, der evtl. auch die höhere Zahl der NAS Gene zurück zu führen ist.

Im Gegensatz zu Gerste und Reis bildet Tomate keine Phytosiderophore (PS) und besitzt nur ein einzelnes NAS Gen. Die 4 NAS Gene in *A. thaliana* gehen allerdings weniger wahrscheinlich auf eine erhöhte Fe Effizienz zurück, als auf globale Duplikationen in der Genomstruktur. Die Ähnlichkeit der Anordnung von molekularen Markern in unmittelbarer Umgebung der NAS Gene deuten außerdem darauf hin, dass die 4 NAS Gene in *A. thaliana* (*AtNAS*) und das einzelne NAS Gen in *S. esculentum* (*SeNAS*) im Zuge der Evolution aus einem einzigen ursprünglichen NAS Gen eines gemeinsamen Vorfahren hervorgingen [Bauer et al. (2004b)]. Im Gegensatz dazu scheinen die NAS Gene der besprochenen Gräser aus mindestens zwei ursprünglichen NAS Gene hervorgegangen zu sein [Perovic et al. (2007)]. Die phylogenetische Verwandtschaft der bislang annotierten NAS Proteine ist, soweit Sequenzen verfügbar waren, in Abbildung 1.8 dargestellt.

1.3.5 Transporter von Nicotianamin

NA ist die direkte biochemische Vorstufe in der Synthese von PS (vgl. Abbildung 1.4 auf Seite 13) und zeichnet sich durch eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu PS aus. Das

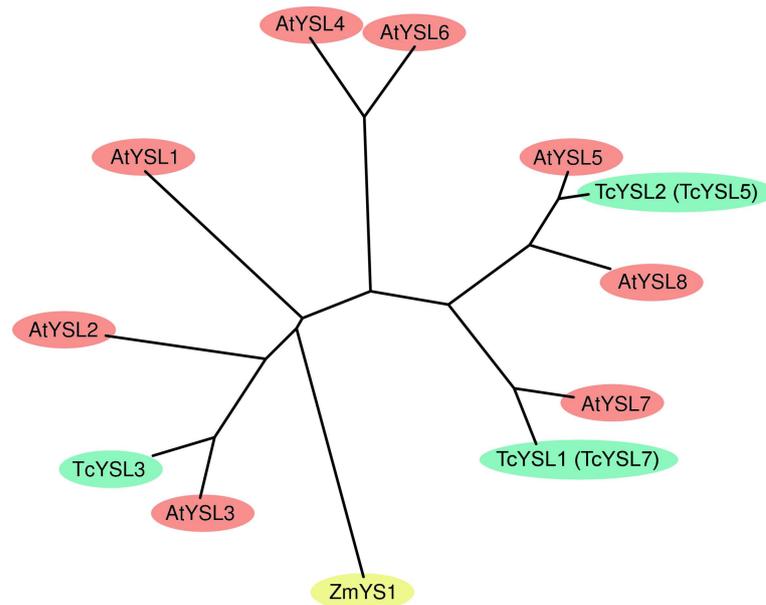


Abbildung 1.9: Phylogenetische Verwandtschaft der bislang annotierten YSL Proteine. Zm = *Zea mays*, Mais; At = *Arabidopsis thaliana*; Tc = *Thlaspi caerulescens*. Auf die Darstellung der 18 YSL Mitglieder aus *Oryza sativa* (Reis) wurde aus Gründen der Übersicht verzichtet. Darstellung generiert mit phylip (3.67) auf der Basis von CLUSTALW (2.0) Alignments der Proteinsequenzen.

Genom von *A. thaliana* birgt 8 Gene mit großer Ähnlichkeit zu *ZmYS1*, die die Familie der YSL (yellow-stripe1-like) Transporter bilden. Da *A. thaliana* als Strategie I Pflanze keine PS synthetisiert, ist NA das wahrscheinliche Substrat dieser Transporter, zumal an *ZmYS1* neben Fe(III)-DMA auch Fe(II)-NA Transport gezeigt werden konnte [Curie et al. (2001)].

Näher untersucht wurden bislang die zu *ZmYS1* ähnlichsten Mitglieder dieser Familie, *AtYSL1*, *AtYSL2* und *AtYSL3* (vgl. Abbildung 1.9). Unter Fe Mangel ist die Expression dieser 3 YSL Gene sowohl im Sproß als auch in der Wurzel (nicht *YSL3*) reprimiert, während ein erhöhtes Fe Angebot die Genexpression induziert. DiDonato et al. (2004) erklärten dieses Expressionsverhalten am Beispiel von *YSL2* mit einer Restriktion der Xylementladung in reifen Geweben um die Versorgung bedürftiger jüngerer Gewebe sicher zu stellen. Schaaf et al. (2005) interpretieren diese übrigens in gleichem Maß auch von Zn abhängige Regulation mit einer Funktion in der Speicherung und Detoxifizierung von Metallionen. Zusätzlich zur Regulation durch Fe ist *YSL2* bei Cu Mangel reprimiert und bei Zn Mangel induziert [DiDonato et al. (2004)].

Entsprechend Promotor-GUS (P^{YSL} -GUS) Studien ist die Expression der drei YSL Gene vornehmlich im Parenchym der Leitbündel von Wurzel, Sproß und Blättern lokalisiert [DiDonato et al. (2004), Schaaf et al. (2005), Le Jean et al. (2005), Waters et al. (2006)]. Zusätzlich dazu sind *YSL1* und *YSL3* auch in unterschiedlichen Geweben der Blüte sowie in den Schoten (nur bekannt für *YSL1*) exprimiert. Im Gegensatz zu den Einzelmutanten *ysl1* und *ysl3* zeigte die Doppelmutante *ysl1ysl3* eine deutliche interkostale Blattchlorose und einen partiellen Defekt in der Entwicklung von Pollen und Embryo, was eine deutlich

reduzierte Samenausbeute und Keimungsrate (18 % gegenüber 93 % Wild Typ) zur Folge hatte. Diese Beobachtung deutet auf eine essentielle aber teilweise redundante Funktion dieser beiden *YSL* Gene hin. Weitere interessante Merkmale der *ysl1ysl3* Mutante sind die Akkumulierung von Cu im Spross sowie eine reduzierte Remobilisierung von Cu und Zn aus dem Blättern [Waters et al. (2006), Waters und Grusak (2007)] - beides Aspekte, die in Bezug auf die Funktion von NA Rückschlüsse zulassen.

Die Frage, ob Mitglieder der *YSL* Familie tatsächlich NA-Metall Komplexe transportieren können, wird allerdings kontrovers diskutiert. DiDonato et al. (2004) berichteten die Komplementierung der Hefemutanten *fet3fet4* (defekt in der Eisenaufnahme) und *ctr1* (defekt in der Kupferaufnahme) durch Transformation mit *AtYSL2* und Fe(II)-NA bzw. Cu(II)-NA im Medium. Allerdings konnten Schaaf et al. (2005) dieses Resultat mit einem anderen Expressionsvektor nicht bestätigen. Laut Waters et al. (2006) sollen sogar sämtliche *YSL* Gene aus *A. thaliana*, mit Ausnahme von *YSL3*, *fet3fet4* bei Zugabe von Fe(II)-NA komplementieren. Da diese Aussage jedoch mit „unpublished data“ beschrieben ist und Zweifel an der Eignung des benutzten Expressionsvektors bestehen [Schaaf et al. (2005)], ist diese Aussage eher mit Vorsicht zu betrachten und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Phänotypen der *ysl1* und *ysl1ysl3* Mutanten deuten jedenfalls auf eine Funktion dieser beiden *YSL* Proteine im Transport von Fe(II)-NA und Cu(II)-NA hin.

1.3.6 Die Rolle von NA bzw. *NAS* Genen in der Metall Homöostase höherer Pflanzen

Ein Großteil des Wissensstands über die Funktion von NA bzw. *NAS* Genen stammt aus der Untersuchung von natürlichen Metall Hyperakkumulatoren sowie der Untersuchung von gentechnisch modifizierten Pflanzen, die durch das Transgen in ihrem NA Gehalt modifiziert wurden. In der Folge werden die dadurch gewonnenen Erkenntnisse erläutert.

1.3.6.1 Metall Hyperakkumulatoren

Metall Hyperakkumulatoren sind Pflanzenspezies, die ihre Toleranz gegenüber hohen Metallkonzentrationen im Boden durch eine gesteigerte Aufnahme und Translokation erreichen. Per Definition werden solche Pflanzen als Hyperakkumulatoren bezeichnet, in denen ein akkumuliertes Metall mindestens 1 % des Trockengewichts erreicht. Derzeit sind mehr als 400 Metall hyperakkumulierende Pflanzenspezies beschrieben [Clemens (2001)]. In Tabelle 1.2 ist eine Übersicht der in dieser Arbeit genannten Metall Hyperakkumulatoren aufgelistet.

Der Hyperakkumulator *A. halleri* kommt u. a. auf Zn kontaminierten Böden im Harz (Mitteldeutschland) vor und zeichnet sich durch eine konstitutive Aufnahme von Zn auch auf nicht kontaminierten Böden aus. Durch seine enge Verwandtschaft zu der (nicht Metall hyperakkumulierenden) Modellpflanze *A. thaliana* konnte in vergleichenden Microarray

Tabelle 1.2: Übersicht über in dieser Arbeit erwähneter Metall-Hyperakkumulatoren sowie die Rolle von NA in der erhöhten Toleranz gegenüber Schwermetallen. W = Wurzel; S = Sproß; ↑ = induziert

Pflanzenspezies	Pflanzenfamilie	hyperakk. Metall	Rolle von NAS/YSL
<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	Zn, Cd	NAS2 (W) NAS3 (S) ↑
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae	Zn, Ni	unklar (s. Text)
<i>Alyssum lesbiacum</i>	Brassicaceae	Ni	n. bekannt

Studien, unter Nutzung des 8K Affymetrix Chips für *A. thaliana*, Gene identifiziert werden, die in *A. halleri* zur konstitutiven Aufnahme von Zn führen [Becher et al. (2004) (Spross) Weber et al. (2004) (Wurzel)]. Das Transkript von *AhNAS2*, benannt durch seine Homologie zu *AtNAS2*, war in Wurzeln um das 73fache induziert. Weitere in der Wurzel induzierte Gene waren ein ZIP Transporter (42fach) sowie weitere Transporter und Enzyme, die der Detoxifizierung und dem Schutz vor ROS dienen. Biochemische Analysen zeigten eine um das 3fache erhöhte Konzentration von NA in Wurzeln [Weber et al. (2004)]. Auch im Sproß waren neben *AhNAS3* ebenfalls Transporter der ZIP und auch der HMA Familie induziert [Becher et al. (2004)]. Leider existieren keine Daten über die NA Konzentrationen im Sproß von *A. halleri*, da davon ausgegangen werden kann, dass zumindest ein Teil des in den Wurzeln synthetisierten NA als Metall-NA Chelat in den Sproß transportiert wird. Dennoch ist davon auszugehen, dass NA in der Toleranz von *A. halleri* gegenüber Schwermetallen eine Schlüsselrolle zukommt.

Eine Beteiligung von NA an der Toleranz gegenüber Schwermetallen wurde auch an *T. caerulescens* beschrieben [Mari et al. (2006)]. Dem zufolge akkumuliert NA unter Ni Stress in der Wurzel und Ni(II)-NA Chelat bildet die überwiegende Form von Ni im Xylem. Die Autoren postulieren weiter eine alleinige, Ni unabhängige NA Synthese in den Blättern und sprechen in einer weiteren Arbeit [Gendre et al. (2007)] den drei konstitutiv stark exprimierten *TcYSL* Genen eine zentrale Rolle in der Metall Toleranz zu. Die Expressionsanalysen in Wurzeln basierten jedoch auf der Sequenz des nicht aus Wurzeln, sondern aus Blättern isolierten *TcNAS* Gens. Weiter ergaben komparative Microarray Versuche zwischen *T. caerulescens* und *A. thaliana* eine differentielle Expression von mindestens vier zu den *AtNAS* ähnlichen *TcNAS* Genen [van de Mortel et al. (2006)]. Daher ist die Hypothese der allein durch erhöhten NA Transport vermittelten Metall Toleranz von *T. caerulescens* zumindest zweifelhaft und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.3.6.2 Transgene Pflanzen

Im vorangehenden Abschnitt wurde die Toleranz von Metall Hyperakkumulatoren gegenüber Schwermetallen mit einem erhöhten NA Gehalt in Verbindung gebracht. Eine Bestätigung dieses Zusammenhangs ergab auch die Untersuchung transgener, im NA Gehalt modifizierter Pflanzen. So konnte eine erhöhte Toleranz gegenüber Ni auch an mit unterschiedlichen *NAS* Genen transformierten *A. thaliana* und *N. tabacum* Pflanzen beobachtet werden [Douchkov (2003), Douchkov et al. (2005), Kim et al. (2005), Pianelli et al.

(2005)]. Weiter führten erhöhte NA Konzentrationen in transgenen *P_{CaMV-35S}::AtNAS1 N. tabacum* Pflanzen zu einer moderaten Anhebung des Gehalts an Fe (~1,5x), Zn und Mn, nicht aber Cu. Neben der erhöhten Ni Toleranz zeigten diese Pflanzen auch eine erhöhte Toleranz gegenüber Fe Mangel [Douchkov et al. (2001), Douchkov et al. (2005)].

Einen gegenteiligen Effekt erzielten Takahashi et al. (2003) durch die Transformation von Tabak mit *hvnaat-A* unter der ektopischen Kontrolle des CaMV-35S Promotors. Das Enzym NAAT, in Tabak normalerweise nicht vorhanden, metabolisierte endogenes NA des Tabak, so dass NA in Pflanzenextrakten nicht mehr detektierbar war. Derart modifizierte NA freie Tabak Pflanzen zeigten ähnliche Symptome wie die NA freie Mutante *chloronerva*, namentlich eine stark ausgeprägte interkostale Chlorose in jungen Blättern sowie Sterilität. Im Gegensatz zu *chloronerva* führte der NA Mangel in Tabak aber nicht zu einer Akkumulation von Fe im Sproß. Stattdessen nahm in Blättern des Tabaks der Gehalt an Metallen in der Reihenfolge Cu > Fe > Zn > Mn ab, was in etwa der Reihenfolge der Affinität zu NA entspricht (vgl. Tabelle 1.1 auf Seite 25). Diese von den Beobachtungen an *chloronerva* abweichende Auswirkung auf die Metallhomöostase ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten. Die Desaminierung von NA ruft neben dem NA Mangel wahrscheinlich auch die Akkumulation des dem NA zwar ähnlichen, aber in Tabak normalerweise nicht vorkommenden Chelators DMA hervor, dessen Vorkommen und Einfluss von den Autoren nicht weiter untersucht worden ist. Es ist daher nahe liegend, dass die Akkumulation eines artfremden Chelators einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Metallhomöostase haben könnte, der mit den Auswirkungen des NA Mangel interferiert.

1.4 Modifizierung der Metallhomöostase mittels der grünen Gentechnik - Optimierung der Effizienz von Kulturpflanzen

1.4.1 Eisenmangel in der menschlichen und pflanzlichen Ernährung - konventionelle Lösungsansätze

Wie unter Abschnitt 1.1.1.4 auf Seite 4 bereits ausgeführt, stellt Eisenmangel beim Menschen nicht nur die am weitesten verbreitete Mangelerkrankung weltweit dar, sondern verursacht in Ausprägung der Eisenmangel-Anämie auch enormen wirtschaftlichen Schaden durch eine eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit der Bevölkerung. Daher ist die Bekämpfung des ernährungsbedingten Eisenmangels in vielen Entwicklungsländern ein erklärtes Ziel der Weltgesundheits Organisation (WHO). Eine flächendeckende Supplementierung mit pharmazeutischen Präparaten setzt allerdings eine effiziente Infrastruktur voraus. Gerade in bedürftigen Entwicklungsländern mit typischerweise mangelnder Infrastruktur wird so die Versorgung mit pharmazeutischen Präparaten zu einer logistischen Herausforderung. Darüber hinaus sind die Entwicklungsländer nur eingeschränkt in der Lage, die immensen Transportkosten allein zu tragen.

Nicht nur die Leistungsfähigkeit des Menschen, auch die Leistungsfähigkeit von Kulturpflanzen hängt entscheidend von einer optimalen Versorgung mit Fe ab. Insbesondere auf kalkhaltigen Böden, die 30 % des weltweit nutzbaren Ackerlandes ausmachen, stellt die mangelnde Versorgung mit Fe einen wesentlichen, das Pflanzenwachstum und damit die Ernteerträge limitierenden Faktor dar. Die Versorgung mit Fe ist dabei weniger ein Problem des Vorkommens, sondern der pH abhängigen Löslichkeit von Fe im Boden (vgl. Abschnitt 1.1.1.1 [Guerinot (2001)]). Böden können zwar mit Fe gedüngt werden, aber auch das ist mit hohen Kosten verbunden, da Fe nicht in mineralischer Form, sondern als Chelat (z. B. FeEDTA) ausgebracht werden muss, um die Löslichkeit des Fe zu gewährleisten. Weiter stellt die Strategie der Düngung neben finanziellen und logistischen Problemen auch eine schwer überschaubare Belastung für die Umwelt dar.

Ein Vergleich unterschiedlicher Getreidearten auf kalkhaltigen Böden macht deutlich, dass die Fe Effizienz einer Kulturpflanze artspezifisch stark unterschiedlich sein kann und dass durchaus natürliche Mechanismen existieren, die ein effizientes Wachstum auch unter widrigen Umweltbedingungen ermöglichen. Gerste synthetisiert eine Vielzahl unterschiedlicher Phytosiderophore und besitzt zudem mit HvYSL1 einen hoch spezifischen Fe(III)-MA Transporter (vgl. Abschnitt 1.2.1.2/ S. 14). Reis und Mais synthetisieren hingegen jeweils nur DMA und der relativ unspezifische Fe(III)-DMA Transport steht in diesen Pflanzen in direkter Konkurrenz zu anderen Metall-DMA Chelaten. Eine Nutzung der molekularen Mechanismen besonders Fe effizienter Arten in weniger Fe effizienten Arten stellt nicht nur eine interessante Alternative zur Fe Düngung des Bodens dar. Auch die Fe Supplementierung von Menschen mit pharmazeutischen Präparaten könnte auf diese Art und Weise ersetzt und der große logistische Aufwand als wichtigster Kostenfaktor minimiert werden.

1.4.2 Das Potential von in der Metallhomöostase optimierten, transgenen Kulturpflanzen

Eine gesellschaftlich akzeptierte Strategie zur Verbesserung von ökonomisch wichtigen Kulturpflanzen stellt die Züchtung dar, die jedoch sehr zeitaufwändig und durch Artgrenzen nur stark eingeschränkt einsetzbar ist. Wesentlich effizienter, aber gesellschaftlich wenig akzeptiert, ist der Einsatz von biotechnologisch optimierten Kulturpflanzen. Durch zielgerichtete Anpassung der Physiologie solcher Pflanzen ist sowohl eine Steigerung der Ernteerträge als auch der Nahrungsqualität möglich. Die Vorteile eines solchen Lösungsansatzes werden in der Folge erläutert.

1.4.2.1 Golden Rice

Das wohl populärste Beispiel für eine der Verbesserung des Nährstoffgehalts dienende Modifikation einer Kulturpflanze ist der so genannte "golden rice" (goldener Reis). Forschern aus Zürich und Freiburg ist es gelungen, durch Transformation von zwei Genen

aus *Narcissus pseudonarcissus* (Osterglocke) sowie einem Gen aus dem Bakterium *Erwinia uredovora* den Syntheseweg von β -Carotin (Provitamin A) in *Oryza sativa* (Reis) einzuführen [Ye et al. (2000)]. Durch die Akkumulation von β -Carotin im Endosperm des Reiskorns nahm dieses eine gelblich-orange Färbung an, die für die Namensgebung des „golden rice“ verantwortlich ist. Nach einer Testphase wird die erste Generation des „golden rice“ mittlerweile auf den Philippinen, Indonesien, Indien und China in lokale Arten eingekreuzt und die zur Zulassung nötigen Tests durchgeführt. Eine weitere Optimierung der β -Carotin Biosynthese führte zum so genannten „golden rice 2“, dessen Gehalt an β -Carotin im Vergleich zur ersten Generation des „golden rice“ um mehr als das 20-fache erhöht ist [Paine et al. (2005)]. Mit der Anreicherung mit Vitamin A erhofft man sich, den v.a. in den Entwicklungsländern Asiens weit verbreiteten Mangel an Vitamin A zu mildern. Darüber hinaus wird mittlerweile auch daran gearbeitet, „golden rice“ mit weiteren wichtigen Nährstoffen wie Vitamin E, Eisen und Zink anzureichern. Gerade vor dem Hintergrund, dass die Verwertung von Provitamin A in der Leber Eisen als Kofaktor benötigt, könnte die Erhöhung des Eisengehalts von „golden rice“ auch zu einer weiteren Verbesserung der Vitamin A Versorgung führen.

1.4.2.2 Modifizierung der Metallhomöostase in Pflanzen - Erfolge und Einschränkungen

In „golden rice“ wurde ein komplett neuer, in Reis nicht vorhandener Syntheseweg eingeführt. Dem gegenüber stehen transgene Ansätze zur Anreicherung von Fe in Samen bzw. Früchten vor dem elementaren Problem, dass pflanzeneigene Mechanismen der Metallhomöostase die Wirkung des Transgens entweder teilweise oder vollständig inhibieren. Während die Eisenaufnahme von Pflanzen durch eine Vielzahl von Transgenen gesteigert werden konnte (u. a. Fe-Reduktase [Samuelsen et al. (1998), Connolly et al. (2003)], Ferritin [Deák et al. (1999), Van Wuytswinkel et al. (1999)]; NAAT [Takahashi et al. (2001)], NAS [Douchkov et al. (2001)]), blieb die Akkumulation von Fe meist auf die vegetativen Organe der transgenen Pflanzen beschränkt.

Die Metallhomöostase von Pflanzen ist primär darauf ausgerichtet, nur die für die Pflanze notwendigen Mengen an Metallen aufzunehmen und sich vor der Toxizität von darüber hinaus gehenden Mengen zu schützen. Eine Erhöhung der Aufnahme von Fe führt dem zufolge sehr wahrscheinlich zur Aktivierung von detoxifizierenden Mechanismen, die beispielsweise im Ferritin und damit in den Chloroplasten des Mesophylls vegetativer Blätter münden. Eine erhöhte Ablagerung von Metallen in den der Reproduktion dienenden, und dadurch besonders vor potentiell toxischen Metallen zu schützenden Früchten oder Samen ist unter diesem Gesichtspunkt eher als unwahrscheinlich zu betrachten. Dieses Problem konnte zumindest teilweise gelöst werden, indem in Reis das Ferritin-Gen aus *Glycine max* L. (Sojabohne) unter der Kontrolle des Endosperm spezifischen Glutelin Promotors exprimiert wurde. Die so gezielt im Samen induzierte Akkumulation von Ferritin führte in der Tat zu einer moderaten Akkumulation von Fe und Zn in Reissamen [Vas-

[concelos et al. \(2003\)](#)]. Allerdings ist die Rate der Fe Akkumulation, 1–4x im Vergleich zu Samen von Kontrollpflanzen, unter dem Gesichtspunkt, dass Fe in derart geschältem und poliertem Samen von Kulturreis praktisch nicht vorkommt, eher nüchtern zu betrachten.

1.4.3 Langfristige Entwicklung von Fe optimierten Kulturpflanzen

Eine erfolgreiche Generierung von transgenen Kulturpflanzen, die signifikant größere Mengen an Fe nicht nur mobilisieren und aufnehmen, sondern auch in den zu verzehrenden Pflanzenteilen ablagern, erfordert eine komplexere, die Gesamtheit der Metallhomöostase einbeziehende Herangehensweise. Das langfristige Ziel ist dabei die Generierung von Multitransformanten, in denen Transgene gezielt an Schlüsselstellen der Metallhomöostase die Translokation von Fe selektiv in Richtung der reproduktiven Organe lenken [[Grusak und DellaPenna \(1999\)](#)]. Dabei ist allerdings zu beachten, dass eine Anreicherung von toxischen Schwermetallen durch unselektive Transportmechanismen ebenso zu vermeiden ist, wie die Anreicherung von Pflanzenstoffen wie Phytat oder Oxalsäure, die die Verfügbarkeit von Fe in der menschlichen Ernährung herabsetzen. Ein umfassendes Verständnis der molekularen Zusammenhänge im Metallhomöostase Netzwerk ist daher eine Grundvoraussetzung für den Erfolg eines solchen die Gesamtheit der Metallhomöostase berücksichtigenden transgenen Ansatzes.

Während die Mechanismen der Fe Mobilisierung und Aufnahme auf molekularer Ebene zum großen Teil aufgeklärt sind, ist bislang jedoch wenig über die molekularen und regulatorischen Zusammenhänge des Metallhomöostase Netzwerks *in planta* bekannt. Die Beobachtungen an der Tomaten Mutante *chloronerva* sowie den diversen *NAS* überexprimierenden transgenen Pflanzen zeigen jedoch, dass NA in der Metall- und insbesondere der Fe-Homöostase zweifellos eine Schlüsselrolle spielt. *NAS* Gene und potentielle Fe-NA Transporter sind daher viel versprechende Kandidaten für auf die menschlichen Bedürfnisse angepasste, Fe akkumulierende multitransformante Kulturpflanzen.

Bislang ist es allerdings nur bedingt gelungen, NA fest in das Netzwerk der Metallhomöostase zu integrieren. Dies liegt zum einen an der Vielfalt der beteiligten Metalle, da NA neben mehreren essentiellen Schwermetallen (Fe, Cu, Zn, Mn) auch nicht-essentielle Schwermetalle (Ni, Cd) effektiv bindet und damit potentiell sowohl an ernährenden als auch an detoxifizierenden Funktionen beteiligt sein kann. Neben der dadurch zu erwartenden hohen Komplexität der Regulation von NA stellt auch das Versuchsobjekt Tomate, als die bislang einzig verfügbare Pflanzenart, in der der Mangel an NA frei von Sekundäreffekten untersucht werden konnte, einen limitierenden Faktor dar. Zwar wurden in Tomate die Mutanten von zwei wesentlichen Elementen der Fe-Homöostase, das *NAS* Gen und der Transkriptionsfaktor *SeFER*, isoliert und weitgehend charakterisiert. Dennoch ist zu bedenken, dass diese Mutationen jeweils spontan aufgetreten sind. Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Komponenten der Metallhomöostase in Tomate gestaltet sich als schwierig und zeitaufwändig. Zum einen benötigt Tomate lange Generationszeiten. Weiter ist die Kultivierung großer Zahlen an Individuen, wie sie bei-

spielsweise bei Untersuchungen mutagenisierter Populationen notwendig ist, bei Tomate mit großem Bedarf sowohl an Anbaufläche als auch an Personal gebunden. Auch sind die in Tomate zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden im Vergleich zu anderen Modellpflanzen als sehr eingeschränkt zu bezeichnen. Insbesondere die mittlerweile zwar in Angriff genommene aber noch nicht vollendete Sequenzierung der genomischen Sequenz von Tomate stellt ein nicht zu unterschätzendes Hindernis in der Charakterisierung von regulatorischen Netzwerken dar. Die Vorteile eines sequenzierten Genoms sowie einer Vielzahl etablierter molekularbiologischer Methoden sollen in der Folge am Beispiel der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* erläutert werden.

1.5 Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*

Die zu den Brassicaceen zählende Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., wurde erstmals im 16. Jahrhundert durch den im Südharz wirkenden Johannes Thal unter dem Namen *Pilosella siliquosa* beschrieben. Durch Untersuchungen an Interphase Zellkernen bestimmte der Botaniker Friedrich Laibach bereits zu Beginn des 20ten Jahrhunderts indirekt die für Pflanzen ungewöhnlich geringe Chromosomenzahl von $n=5$ [Laibach (1907)]. Mehr als drei Jahrzehnte später schlug Friedrich Laibach erstmals *A. thaliana* als Modellpflanze für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen vor [Laibach (1943)].

Die Kultivierung von *A. thaliana* ist mit geringem Platzbedarf verbunden und führt unter optimalen Bedingungen innerhalb von 5-6 Wochen Generationszeit zu einer Samenausbeute von bis zu 10 000 Samen pro Einzelpflanze. Als Selbstbestäuber lassen sich Linien von *A. thaliana* mit geringem Aufwand reinerbig vermehren, wobei bei Bedarf auch gezielte Kreuzungen möglich sind. Neben diesen für die klassische Genetik wichtigen Eigenschaften, kurzer Generationszyklus bei gleichzeitig großer Zahl an Nachkommen, lassen sich in *A. thaliana* mit überschaubarem Aufwand genetische Variationen durch Mutagenese (z. B. Röntgenstrahlung oder EMS Behandlung der Samen) induzieren. Unter selektiven Bedingungen, beispielsweise einem Screening auf Defekte in der Aktivität der Fe-Chelat Reduktase (vgl. Abschnitt 1.2.1.1 / S. 10), isolierte Mutanten stellten lange Zeit den einzigen experimentellen Ansatz zur Aufklärung eines Stoffwechselweges dar. Mit den Methoden der molekularen Genetik, insbesondere der Genkartierung, waren so über den als „forward genetics“ bezeichneten experimentellen Ansatz die ersten funktionellen Charakterisierungen von Genen aus Pflanzen möglich.

A. thaliana besitzt mit ca. 125 Mbp eines der kleinsten Pflanzengenome überhaupt und zeichnet sich insbesondere durch einen besonders geringen Anteil an repetitiven Sequenzen aus. Diese Eigenschaft ermöglichte die Sequenzierung des Genoms von *A. thaliana* als erstes Pflanzengenom, da mit dem Stand der Sequenzierungstechnik der späten 1990er Jahre Pflanzengenome mit üblicherweise hohem Anteil an repetitiven Sequenzen nicht effektiv sequenziert werden konnten. Die ca. 27 000 Gene umfassende Genom-

sequenz von *A. thaliana* wurde im Jahr 2000 in ihrer ersten Version vorgestellt [[Arabidopsis Genome Initiative \(2000\)](#)]. Mit ihrer Verfügbarkeit war die Identifizierung tausender bislang unbekannter Gene möglich geworden, denen, durch Ähnlichkeiten mit Sequenzen bereits charakterisierter Gene, zum großen Teil potentielle Funktionen zugewiesen werden konnten. In der sog. postgenomischen Ära der *Arabidopsis* Forschung wurde eine Vielzahl an Methoden zur funktionellen Analyse von komplexen, regulatorischen Netzwerken geschaffen. Die Vielfalt der genomweiten Untersuchungsmethoden umfasst dabei neben dem Transkriptom auch das Proteom und das Metabolom. Durch die Schwerpunktsetzung der vorliegenden Arbeit soll in der Folge nur auf die Methoden der Transkriptomanalyse sowie der Mutantenanalyse näher eingegangen werden.

1.5.1 Transkriptomanalyse

Durch stetige Verfeinerung der Microarray Technik war es im Jahr 2002 mit der Veröffentlichung des ATH1 Chips der Firma Affymetrix erstmals möglich, mit 22 500 Genen nahezu das gesamte Transkriptom eines Organismus in einem einzelnen Experiment parallel zu untersuchen. In aufwändigen Großprojekten, beispielsweise das DFG finanzierte AtGenExpress, wurden insbesondere mit dem ATH1 Chip öffentlich zugängliche Datensätze produziert, in denen die Transkriptome unterschiedlicher Gewebe, Entwicklungsstadien sowie Stresssituationen abgelegt sind. Über bioinformatische Werkzeuge zur Microarray Analyse im Internet, z. B. Genevestigator [[Zimmermann et al. \(2004\)](#)] oder BAR [[The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics](#)], stehen so der *Arabidopsis* Forschung eine steigende Zahl an Datensätzen zur Verfügung, anhand derer das Transkriptom eines interessierenden Gens unter unterschiedlichen Aspekten *in silico* untersucht werden kann und aufgrund dessen neue Hypothesen zur Beantwortung von biologischen Fragestellungen entwickelt werden können. Aufgrund der nicht kompletten Abdeckung des *Arabidopsis* Transkriptoms durch den ATH1 Chip ist die Vernetzung allerdings als lückenhaft zu bezeichnen. Insbesondere in der Analyse der Metallhomöostase fehlen auf dem ATH1 Chip wichtige Gene wie beispielsweise *FRO1*, *FRO2* und *BHLH100*. Neuere Entwicklungen in der Microarray Technik schliessen auch diese Lücke. Beispielsweise decken die „*Arabidopsis 3*“ Microarrays der Firma Agilent mit insgesamt 37 683 Transkripten nicht nur nahezu sämtliche, Proteine kodierende Transkripte ab, sondern berücksichtigt auch ca. 10 000 nicht kodierende Transkripte wie z. B. *miRNAs*, die in der Regulation von komplexen Netzwerken eine wichtige Rolle spielen können.

1.5.2 „reverse genetics“ durch T-DNA Mutagenese

Die sehr effektive Transformation durch das Eintauchen der Blüten in eine Nährlösung mit *Agrobacterium tumefaciens*⁴ [[Clough und Bent \(1998\)](#)], dessen Plasmid die T-DNA mit

⁴Seit 2001 lautet der phylogenetisch korrekte Name *Rhizobium radiobacter* [[Young et al. \(2001\)](#)]. Aus traditionellen Gründen wird der ursprüngliche Name in der Pflanzenbiologie jedoch weiter gepflegt. Zum besseren Verständnis wird daher auch in dieser Arbeit der klassische Name *A. tumefaciens* verwendet.

dem Transgen trägt, ermöglicht Transformationen von *A. thaliana* mit hohem Durchsatz. Da die Integration der >5 kbp großen T-DNA in das Pflanzengenom nahezu zufällig erfolgt, wurde die durch *A. tumefaciens* vermittelte Transformation auch zur Mutagenese genutzt. Im Gegensatz zu den Modellsystemen Maus und Hefe ist in *A. thaliana* kein gezieltes Ausschalten einzelner Genen möglich. Daher ist die T-DNA Insertions Mutagenese zusammen mit der hier nicht näher beschriebenen Transposon Insertion Mutagenese, die derzeit einzige Möglichkeit, über „reverse genetics“ gezielte funktionelle Untersuchungen an Genfamilien bekannter Genomsequenz durchzuführen.

Mehrere teils öffentlich (z. B. SALK, [Alonso et al. (2003)]; GABI-kat, [Li et al. (2003)]), teils durch Firmen (Syngenta, [Sessions et al. (2002)]) finanzierte Großprojekte führten zur Generierung von umfassenden T-DNA Insertions Kollektionen, in denen mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit ein Großteil der ca. 27 000 Gene durch eine inserierte T-DNA unterbrochen wurde. Die Sequenzierung der die T-DNA flankierenden genomischen Sequenz sowie der Vergleich mit der annotierten genomischen Sequenz ermöglichte die exakte Bestimmung der Position der T-DNA Insertionen in Pflanzengenom. Mittlerweile sind die Annotationen von >500 000 T-DNA Insertionslinien der Großprojekte in einer einzelnen, öffentlich zugänglichen Datenbank [TAIR, Rhee et al. (2003)] gebündelt. Samen von einem Großteil der T-DNA Insertionslinien können zudem direkt über TAIR bei zentralen Versandstellen in Nordamerika (ABRC) und Europa (NASC) bestellt werden und stehen damit Forschern weltweit zur Verfügung.

2 Zielsetzung der Arbeit

Ein detailliertes Verständnis über die molekularen Mechanismen der Metallhomöostase ist eine Grundvoraussetzung für die langfristige Generierung von transgenen Kulturpflanzen, die entsprechend den Bedürfnissen der menschlichen Ernährung in ihrem Metallgehalt optimiert sind (vgl. Abschnitt 1.4.3). Als universeller Chelator essentieller und nicht-essentieller Schwermetall Ionen nimmt Nicotianamin eine zentrale Stellung im Netzwerk der Metallhomöostase ein (vgl. Abschnitt 1.3). Insbesondere die Modifikationen des NA Gehaltes in *P^{CaMV-35S}::NAS* bzw. *nas* knock-out Pflanzen (*chloronerva*) unterstreichen mit ihren globalen Auswirkungen auf die Gehalte und Verteilung vieler Metalle die Wichtigkeit von NA in der Metallhomöostase (vgl. Abschnitt 1.3.4).

Das langfristige Ziel dieser Arbeit war vor diesem Hintergrund die verbesserte Integration von NA in das Netzwerk der Metallhomöostase und damit ein elementarer Beitrag zu einem umfassenden Verständnis der molekularen Mechanismen der Metallhomöostase. Im Fokus stand dabei zunächst eine umfassende Untersuchung der Regulation von *Nicotianamin Synthase (NAS)* Genen im Metallhomöostase Netzwerk. Neben den Auswirkungen von Metallstress in Wild Typ sollte dies auch im Kontext der Analyse von *nas* knock-out Mutanten geschehen. In Anbetracht der limitierenden Untersuchungsmöglichkeiten in Tomate wurde dabei der Entschluß gefasst, die Arbeiten an der methodisch deutlich besser geeigneten Modellpflanze *A. thaliana* durchzuführen. Dabei wurde die Notwendigkeit der Generierung einer neuen *nas* Mutante in *A. thaliana* in Kauf genommen.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war daher die Generierung einer *nas* T-DNA Kollektion in *A. thaliana*. Das sich dadurch eröffnende Potential, mittels reverse Genetik funktionelle Studien an der *NAS* Genfamilie durchführen zu können, sollte dabei über die vorliegende Arbeit hinaus auch die Basis späterer Arbeiten über die Rolle von NA in der Metallhomöostase bilden. Zu diesem Zweck sollten annotierte *nas* T-DNA Insertionslinien zunächst verifiziert werden und dann durch Kreuzungen eine Kollektion von *nas* Mehrfachmutanten entstehen. Die Analyse der so generierten 1x, 2x, 3x und 4x *nas* Mutanten sollte dabei Einblicke in die Funktion und Regulation einzelner *NAS* Gene ermöglichen. Die Auswirkungen der *nas* T-DNA Mutationen auf das Netzwerk der Metallhomöostase sollte dabei methodisch auf Ebene der Genexpression, des Metaboliten Nicotianamin sowie der Metallhomöostase durch Messung von Metallgehalten quantitativ erfasst werden. Weiter wurde angestrebt, in physiologischen Experimenten, die neben Fe

auch die Homöostase weiterer Metalle wie Cu, Zn und Ni, abdecken, erste Aufschlüsse über mögliche, nicht redundante Funktionen der *NAS* Gene zu gewinnen.

Die Integration der *NAS* Gene in das Netzwerk der Metall Homöostase erforderte in besonderem Maße detaillierte Studien zur Regulation der *NAS* Genexpression in kontrollierten physiologischen Experimenten. Unter Einbeziehung von Markergenen der Fe Homöostase (*IRT1*, *FRO2* und *FIT*), sollte so zunächst die Genregulation der vier *NAS* Gene in *A. thaliana* im Kontext der bislang am besten untersuchten Fe Homöostase untersucht und eingeordnet werden. Neben der Ausweitung der im Rahmen der Genexpressionsstudien untersuchten Gene um beispielsweise Kandidaten der potentiell für NA-Metall Chelat Transporter kodierenden *YSL* Genfamilie waren auch vergleichende Studien der *NAS* Genexpression in Mutanten der Fe Homöostase, insbesondere auch der *nas4x* Mutante, angestrebt.

3 Material und Methoden

Allgemein übliche molekularbiologische Standardverfahren wurden nach [Sambrook et al. \(1989\)](#) durchgeführt und sind hier nicht gesondert beschrieben (z.B. Restriktionsverdauung, Agarosegelelektrophorese, Standard PCR, etc.). Weiter entsprachen allgemeine Laboreinrichtungen, verwendete Maschinen, Arbeitsgeräte und Chemikalien den in der Molekularbiologie üblichen Anforderungen und sind hier nicht gesondert aufgeführt.

Im Folgenden sind daher nur die Materialien und Methoden aufgelistet, die für die Durchführung der Arbeit im Speziellen wesentlich waren.

3.1 Material

3.1.1 Pflanzenmaterialien

T-DNA Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana*, Sorte Columbia-0 (Col-0)

Kürzel	Bezeichnung	betroffenes Gen		Position der Insertion
	Name	AGI code	Name	
<i>nas1-1</i>	GABI-kat 223A09	At5g04950	<i>NAS1</i>	Exon, 69 bp nach ATG
<i>nas2-1</i>	Syngenta SAIL 156C08	At5g56080	<i>NAS2</i>	5'-UTR, 70 bp vor ATG
<i>nas2-2</i>	SALK 066962	At5g56080	<i>NAS2</i>	Exon, 144 bp nach ATG
<i>nas3-1</i>	GABI-kat 010A10	At1g09240	<i>NAS3</i>	Exon, 69 bp nach ATG
<i>nas4-1</i>	SALK 135507	At1g56430	<i>NAS4</i>	Exon, 19 bp vor TAG

Weitere Informationen zu den jeweiligen T-DNAs: siehe Abbildung 3.1. Eine Liste sämtlicher verifizierter *nas* T-DNA Insertionslinien ist in Tabelle A.1 im Anhang zu finden.

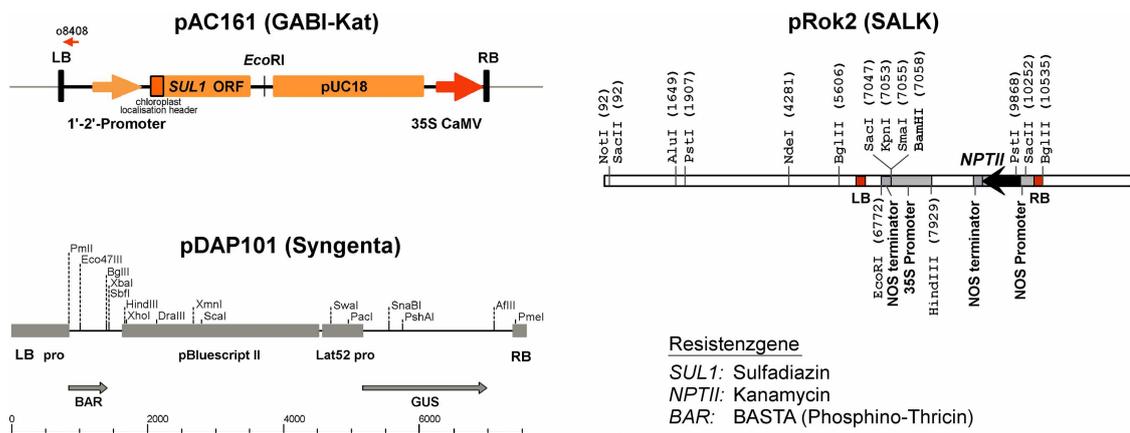


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der inserierten T-DNAs in den verwendeten GABI-Kat, SALK und Syngenta Linien.

3.1.2 Chemikalien

Name	Beschreibung	Hersteller
[α^{32} P] dCTP	Southern Hybridisierung	Amersham (Braunschweig)
ADAM	Adamantan-1-amine, HPLC	Sigma (Hamburg)
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid, HPLC	Sigma (Hamburg)
(-)-Nicotianamin	HPLC Standard	T. Hasegawa Co., Ltd (Tokyo, Japan)
SYBR green I	SYBR green I nucleic acid gel stain	Roche (Mannheim)
Wasser	PCR, HPLC Standard (W4502)	Sigma (Hamburg)

3.1.3 PCR Primer

Sämtliche PCR Primer wurden in einer Konzentration von 100 μ M bei der Firma Metabion (Martinsried) bestellt. PCR Primer für die real-time PCR wurden aus Gründen der Spezifität HPLC aufgereinigt eingesetzt.

Sequenzierung und Genotypisierung von *nas* T-DNA Insertionslinien

T-DNA / Gen, AGI Code	Name	Sequenz
GABI-Kat (G)	GABI T-DNA check	5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3'
GABI-Kat (S)	GABIo8409	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
SALK (G & S)	Salk LB1	5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCT-3'
Syngenta (G)	Syn-LB3short	5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCT-3'
Syngenta (S)	Syn-LB3	5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC-3'
NAS1	NAS1-60-5'	5'-ACGGTTGTTTCATGATCGCG-3'

Verwendung: G = Genotypisierung, S = Sequenzierung

Fortsetzung auf der nächsten Seite

T-DNA / Gen, AGI Code	Name	Sequenz
At5g04950	NAS1-60-3'	5'-TGGAACATATCGCGATTTTTAGTTG-3'
<i>NAS2</i>	NAS2-60-5'	5'-TCGATGGCACTATACTCCTCGATC-3'
At5g56080	NAS2-60-3'	5'-TGTCGCAAGTCATGCACATTC-3'
<i>NAS3</i>	NAS3-60-5'	5'-TTCAGCCCAACAGTGTGCG-3'
At1g09240	NAS3-60-3'	5'-AACTATGCACCCCGTAGAGCC-3'
<i>NAS4</i>	NAS4-60-5'	5'-CCCACCCTTTGCAAATTGC-3'
At1g56430	NAS4-60-3'	5'-CCCACCCTTTGCAAATTGC-3'

Verwendung: G = Genotypisierung, S = Sequenzierung

Detektion von *NAS* Volllänge Transkripten in cDNA Proben

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
<i>NAS1</i>	NAS1-cDNA-check 5'	5'-TATTACTTATCTTCTCCCCTGAAAT-3'
At5g04950	NAS1-cDNA-check 3'	5'-CACAAACTTAACACTTAATAAGCGT-3'
<i>NAS2</i>	NAS2-cDNA-check 5'	5'-ACAATTTCAAACTCAATATTCTCTC-3'
At5g56080	NAS2-cDNA-check 3'	5'-AAGGGCAAAACATAAACACAT-3'
<i>NAS3</i>	NAS3-cDNA-check 5'	5'-CATAGTGTGACATGGGTTGCC-3'
At1g09240	NAS3-cDNA-check 3'	5'-CAATTGAGAAAAGACACCAACACAC-3'
<i>NAS4</i>	NAS4-cDNA-check 5'	5'-CTCATAGTGTGACATGGGTTATTG-3'
At1g56430	NAS4-cDNA-check 3'	5'-ACAAGACTGTAGCAAAAACAGCCA-3'

real-time qPCR Primer

In der folgenden Tabelle sind sämtliche verwendeten real-time PCR Primer aufgezählt. Die Verwendung erfolgte entweder zur Amplifikation von Massenstandards (MS) oder zur Quantifizierung in der real-time qPCR (Q).

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
<i>EF1Alpha2</i> , At5g19510 (MS)	AtEF-temp-5'(1763) AtEF-temp-3'(2776)	5'-GCTGCTAAGAAGGACACCAAG-3' 5'-TGTTCTGTCCCTACTGGATCC-3'
<i>EF1Alpha2</i> , At5g19510 (Q, cDNA)	AtEF-c-5'(2125) AtEF-c-3'(2251)	5'-ACTTGTACCAGTTGGTTATGGG-3' 5'-CTGGATGTACTCGTTGTTAGGC-3'
<i>EF1Alpha2</i> , At5g19510 (Q, gDNA)	AtEF-gen-3'(2726) AtEF-gen-5'(2522)	5'-CCGGGACATATGGAGGTAAG-3' 5'-TCCGAACAATACCAGAACTACG-3'
<i>UBP6</i> , At1g51710 (MS)	AtUBP6-temp-5'(3306) AtUBP6-temp-3'(4397)	5'-TTTCTGTAACCCTCTTGTGGC-3' 5'-GATGTCTTCTTCGCGTTGC-3'
<i>UBP6</i> , At1g51710 (Q)	AtUBP6-c-5'(975) AtUBP6-c-3'(1066)	5'-GAAAGTGGATTACCCGCTG-3' 5'-CTCTAAGTTTCTGGCGAGGAG-3'

Verwendung: MS = Massenstandard, Q = Quantifizierung in real-time PCR

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
<i>NAS1</i>	Atnas5aNG-5'	5'-ATGGCTTGCCAAAACAATCTC-3'
At5g04950 (MS)	Atnas5aNG-n3'	5'-TCTAGACTCGATGGCACTAAACTCCTC-3'
<i>NAS1</i>	AtNAS1-RT541-5'	5'-ATCTTCCACACAACGGACG-3'
At5g04950 (Q)	AtNAS1-RT600-3'	5'-AACGACGTCATATTGGTCAAG-3'
<i>NAS2</i>	Atnas5bNG-5'	5'-ATGGCTTGCGAAAAACAACCTC-3'
At5g56080 (MS)	Atnas5bNG-3'	5'-TCTAGACTCGATGGCACTATACTCCTCGAT-3'
<i>NAS2</i>	AtNAS2-RT854-5'	5'-AGATCGGACGGTGTGTGG-3'
At5g56080 (Q)	AtNAS2-RT943-3'	5'-CCTCGATCAAATCTTCTCCAT-3'
<i>NAS3</i>	Atnas1aNG-5'	5'-ATGGGTTGCCAAGACGAACA-3'
At1g09240 (MS)	Atnas1aNG-3'	5'-TCTAGAAGACAACCTGTTCTCCTAGCTCC-3'
<i>NAS3</i>	AtNAS3-RT836-5'	5'-CAATTGGGAATGTTGGTGG-3'
At1g09240 (Q)	AtNAS3-RT953-3'	5'-TGTTCTCCTAGCTCCG-3'
<i>NAS4</i>	Atnas1bNG-5'	5'-ATGGGTTATTGCCAAGACGACC-3'
At1g56430 (MS)	Atnas1bNG-3'	5'-TCTAGAGGTAAGTTGTTCTTCATTAGCACCTGC-3'
<i>NAS4</i>	AtNAS4-RT810-5'	5'-TGTAATCTCAAGGAAGCTAGGTG-3'
At1g56430 (Q)	AtNAS4-RT893-3'	5'-CAGTTACACGCGAGATCCG-3'
<i>IRT1</i>	AtIRT1-temp-5'(898)	5'-TAGCCATTGACTCCATGGC-3'
At4g19690 (MS)	AtIRT1-temp-3'(1910)	5'-AGAAAACATGAATCGTGGGG-3'
<i>IRT1</i>	AtIRT1-c-5'(1523)	5'-AAGCTTTGATCACGGTTGG-3'
At4g19690 (Q)	AtIRT1-c-3'(1622)	5'-TTAGGTCCCATGAACCTCCG-3'
<i>FRO2</i>	AtFRO2-temp-5'(3110)	5'-CCATGCTCGATCTTGTCTTG-3'
At1g01580 (MS)	AtFRO2-temp-3'(4105)	5'-ATTCCGGAACTTTTGAAAGG-3'
<i>FRO2</i>	AtFRO2-c-5'(1806)	5'-CTTGGTCATCTCCGTGAGC-3'
At1g01580 (Q)	AtFRO2-c-3'(1927)	5'-AAGATGTTGGAGATGGACGG-3'
<i>FIT</i>	AtFRU-temp-5'(1108)	5'-TTCAGTCACAAGCGAAGAAAC-3'
At2g28160 (MS)	AtFRU-temp-3'(2094)	5'-GCGATCCATATAGGTCGTCTG-3'
<i>FIT</i>	AtFRU-c-5'(1392)	5'-GGAGAAGGTGTTGCTCCATC-3'
At2g28160 (Q)	AtFRU-c-3'(1483)	5'-TCCGGAGAAGGAGAGCTTAG-3'
<i>BHLH100</i>	bHLH100-5'(62)	5'-CCTCCCACCAATCAAACG-3'
At2g41240 (MS)	bHLH100-3'(1062)	5'-ATGACATCGGTGTGTAACCAC-3'
<i>BHLH100</i>	bHLH100-RT-5'(348)	5'-AAGTCAGAGGAAGGGGTTACA-3'
At2g41240 (Q)	bHLH100-RT-3'(479)	5'-GATGCATAGAGTAAAAGAGTCGCT-3'
<i>YSL1</i>	YSL1-STD-(1681)-5'	5'-TATTGTAGCTTACATTTTCGCG-3'
At4g24120 (MS)	YSL1-STD-(2705)-3'	5'-CCGAGCCCATAACAGTTTC-3'
<i>YSL1</i>	YSL1-RT-(2429)-5'	5'-TTCTTAGCTTCATAGGATCAGTCAA-3'
At4g24120 (Q)	YSL1-RT-(2552)-3'	5'-GTTCTTGTTCCAGAAGTCTACCTGTT-3'
<i>YSL2</i>	YSL2-STD-(1576)-5'	5'-GATGGCTTGTGTCGGATACTTA-3'
At5g24380 (MS)	YSL2-STD-(2591)-3'	5'-ACCAACTCTCTTTCTGTTCACTTCTTA-3'
<i>YSL2</i>	YSL2-RT-(2246)-5'	5'-TGTATCGGGAGCTTAGTGGTATA-3'
At5g24380 (Q)	YSL2-RT-(2431)-3'	5'-GCCTTAATGAGCCGCAGT-3'
<i>YSL3</i>	YSL3-STD-(2100)-5'	5'-ATTGTATCGATTTCTTCTGACCTAAT-3'

Verwendung: MS = Massenstandard, Q = Quantifizierung in real-time PCR

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Gen, AGI Code	Name	Sequenz
At5g53550 (MS)	YSL3-STD-(3103)-3'	5'-AATATGACGTGTGCTGAATTGAC-3'
YSL3	YSL3-RT-(2530)-5'	5'-CTTGAATATGAGAGATCGAGTTAA-3'
At5g53550 (Q)	YSL3-RT-(2690)-3'	5'-CGAATATTACTCGGCATGAA-3'

Verwendung: MS = Massenstandard, Q = Quantifizierung in real-time PCR

3.1.4 Materialien

Art	Bezeichnung	Hersteller
8 Tube PCR Streifen	G002-A, Lagerung von Aliquots (real-time qPCR / HPLC)	Kisker Biotech (Steinfurt)
HPLC Säule	EC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18	Macherey Nagel (Düren)
Hybridisiermembran	Hybond-N ⁺	Amersham (Braunschweig)
Optische Versiegelungsfolien	iCycler iQ Optical Tape	Bio-Rad (München)
Vorsäulen Kartuschenhalter	KJO-4282	Phenomenex (Aschaffenburg)
Vorsäulen Kartusche	C18 4,0x3,0mm (AJO-4287-S)	Phenomenex (Aschaffenburg)

3.1.5 Geräte

Art	Bezeichnung	Hersteller
Homogenisator	Schwingmühle MM2	Retsch (Haan)
	Laborrührwerk RZR2020	Heidolph (Schwabach)
HPLC Controller und Pumpe	600E	Waters (Eschborn)
HPLC Autosampler	717 plus	Waters (Eschborn)
(HPLC) Fluoreszenz Detektor	920 Intelligent	Jasco (Essex, UK)
PCR-Cycler	GeneAmp 9600 & 9700	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
	primus 96 advanced	PeqLab (Erlangen)
Pflanzenanzuchtschrank	CU 3624	Percival-Scientific (Perry, IA, USA)
Phosphoimager real-time qPCR-Cycler	BAS 3000 Bio-Imaging-Analyzer	Fujifilm (Düsseldorf)
	Mx3000P	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
	MyiQ	Bio-Rad (München)
	iCycler iQ	Bio-Rad (München)
Sterilbank	HeraSafe KS12	Heraeus (Hanau)
	LaminAir HB2448	Heraeus (Hanau)
Ultraschallwasserbad Zentrifugen	Sonorex	Bandelin (Berlin)
	Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
	Biofuge fresco (mit Kühlfunktion)	Heraeus (Hanau)
	Multifuge 1L	Heraeus (Hanau)
	Multifuge 1L-R (mit Kühlfunktion)	Heraeus (Hanau)
	5417 R (mit Kühlfunktion)	Eppendorf (Hamburg)

3.1.6 Kits & Enzyme

Art	Bezeichnung	Hersteller
cDNA Synthese	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase I	DNase I, RNase-free	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Polymerase	ExTaq Hot Start	TaKaRa (Otsu, Japan)
	ExTaq R-RCR Version 2.1 (real-time qPCR)	TaKaRa (Otsu, Japan)
Massenstandard	Mass Ruler DNA Ladder Mix (Gelelektrophorese)	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNA Isolation	Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit	Invitex (Berlin)

3.1.7 Lösungen und Puffer

Verwendetes Wasser wurde mit einer Milli-Q plus PF-Filtereinheit (Millipore) aufgereinigt.

Isolierung genomischer DNA

Extraktionspuffer

200 mM Tris/Cl pH 7,5
 5 mM NaCl
 25 mM EDTA pH 8,0
 5 % SDS

Bestimmung von Nicotianamin

NA-Borat Puffer pH 7,7

0,5 M Borsäure
pH mit NaOH eingestellt

Derivatisierungspuffer

100 mL Na-Borat Puffer pH 7,7
 67 µL 0,5 M EDTA (vor Optimierung)
 1 mL 0,5 M EDTA (nach Optimierung)

Derivatisierungsreagenzien

12 mM Fmoc-Cl (gelöst in Aceton)
 40 mM ADAM (gelöst in Aceton: H₂O, 3:1)
je frisch zubereitet, lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C

Na-Acetat Puffer pH 4,2

50 mM NaOAc
 pH 4,2 mit Essigsäure einstellen
Vacuumfiltration durch 0,45 µm Filter

Laufmittel A

80 % Na-Acetat Puffer pH 4,2
 20 % Acetonitril

Laufmittel B

20 % Na-Acetat Puffer pH 4,2
 80 % Acetonitril

Na-Citrat Puffer pH 2,2

100 mM Citronensäure
 210 mM NaOH
pH 2,2 mit HCl eingestellt

Nicotianamin Standards

1 mM Nicotianamine Stammlösung in Na-Citrat Puffer ($M_r(\text{NA}) = 303,31$)
 Verdünnungsreihe in reinem H_2O auf z. B. 8, 4, 2 und 1 pmol NA
 pro 10 μL Injektionsvolumen

real-time qPCRSYBR green I

1:200 Verdünnung in frischem DMSO, Lagerung in Aliquots von je 1 mL als „main stock“ bei -20°C
 1:10 Verdünnung des „main stock“ in TE Puffer pH 7,5¹, Lagerung in Aliquots
 von je 0,5 mL bei -20°C , nach Auftauen Lagerung bis zu 3 Wochen bei $+4^\circ\text{C}$

3.1.8 Kulturmedien**3.1.8.1 Medien zur Pflanzenanzucht**

		Agarplatten System		Hydroponisches System
		Gamborg B5 pH 5,7	Hoagland pH 6,0	1/4 Hoagland pH 6,0
Makronährstoffe	MgSO_4	1,01 mM	0,75 mM	187,5 μM
	KH_2PO_4	–	0,5 mM	125 μM
	KNO_3	24,73 mM	1,25 mM	312,5 μM
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	–	1,5 mM	375 μM
	CaCl_2	1,02 mM	–	–
	NaH_2PO_4	1,09 mM	–	–
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,01 mM	–	–
Mikronährstoffe	KCl	–	50 μM	12,5 μM
	H_3BO_3	48,5 μM	50 μM	12,5 μM
	MnSO_4	5,9 μM	10 μM	2,5 μM
	ZnSO_4	6,9 μM	2 μM	0,5 μM
	CuSO_4	0,1 μM	1,5 μM	0,375 μM
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	–	0,075 μM	18,75 μM
	FeEDTA	–	50 μM	10 μM
	CoCl_2	0,11 μM	–	–
	KI	6,5 μM	–	–
	NaMoO_4	1 μM	–	–
	Zusätze	Saccharose	1 % (w/v)	1 % (w/v)
Pflanzenagar		0,8 % (w/v)	0,8 % (w/v)	–

3.1.8.2 Pflanzenanzucht auf Erde

- Torfsubstrat 2 (Klasmann)
- Vermiculit (Körnung 1 – 2 mm)
- Töpfe mit Auslaß (50x50x46 mm)
- Euroschale 60x40x6,5

¹Die Stabilität von SYBR green I ist stark pH abhängig. SYBR green I in TE mit üblichem pH 8,0 ist instabil, degradiertes SYBR green I ist ein Inhibitor der PCR [Karsai et al. (2002)].

3.2 Pflanzenmethoden

In diesem Abschnitt werden die Methoden zur Bearbeitung von Pflanzenmaterial von der Anzucht bis zur Ernte und Aufbereitung des Pflanzenmaterial als Vorbereitung weiterer, Analyse spezifischer Extraktionsschritte beschrieben. Variationen in der Zusammensetzung der Pflanzenmedien oder den Anzuchtbedingungen erfolgten entsprechend den Angaben im Ergebnisteil.

3.2.1 Pflanzenanzucht

Oberflächensterilisation von *Arabidopsis* Samen

Zur Abtötung von Bakterien, Pilzsporen und Insekteneiern wurden Samen von *A. thaliana* stets oberflächensterilisiert. Zu diesem Zweck wurden die Samen in 1,5 mL Reagiergefäße überführt und dort unter ständiger Durchmischung mittels eines Überkopf Rotators 9 min in 6 % Na-Hypochloridlösung und 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Lösung in steriler Umgebung durch steriles H₂O ersetzt. Dieser Waschschrift wurde drei Mal wiederholt und die Samen schliesslich in steriler, 0,1 %iger Pflanzenagerlösung aufgenommen. Zum Zweck der Stratifizierung wurden die Samen 2–3 Tage bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Anzucht auf Erde

Torfsubstrat 2 und Vermiculit wurden im Verhältnis von ca. 1:1 bis 2:1 gemischt und zur Abtötung von Insekteneiern mindestens 12 h bei 80 °C in einem Brutschrank gebacken. Töpfe (5×5×4,6 cm, mit Auslaßöffnungen im Boden) wurden locker mit behandelter, aber abgekühlter Erde befüllt und in eine mit Vlies ausgelegte Anzuchtschale (60×40×6,5 cm, ungelocht) mit jeweils ca. 1–2 cm Abstand gestellt. Sterilisierte und stratifizierte *Arabidopsis* Samen wurden mit einem feinen Pinsel auf die Oberfläche der zuvor angefeuchteten Erde ausgelegt und die Schale ca. eine Woche mit einer Glasplatte und eine weitere Woche mit einer Plastikhaube zum Schutz vor Verdunstung bedeckt. Eine moderate Wasserversorgung wurde durch regelmäßiges Befeuchten des Vlieses erreicht. Die Anzucht erfolgte in speziell ausgestatteten Anzuchträumen unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) bei konstant 21 °C sowie 50–60 % Luftfeuchtigkeit. Die Lichtintensität betrug ca. $110–120 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$. Adulte Pflanzen (vgl. Abbildung 3.2a + b) wurden im Alter von ca. 6–8 Wochen trocken gelassen und in der Folge die Samen geerntet.

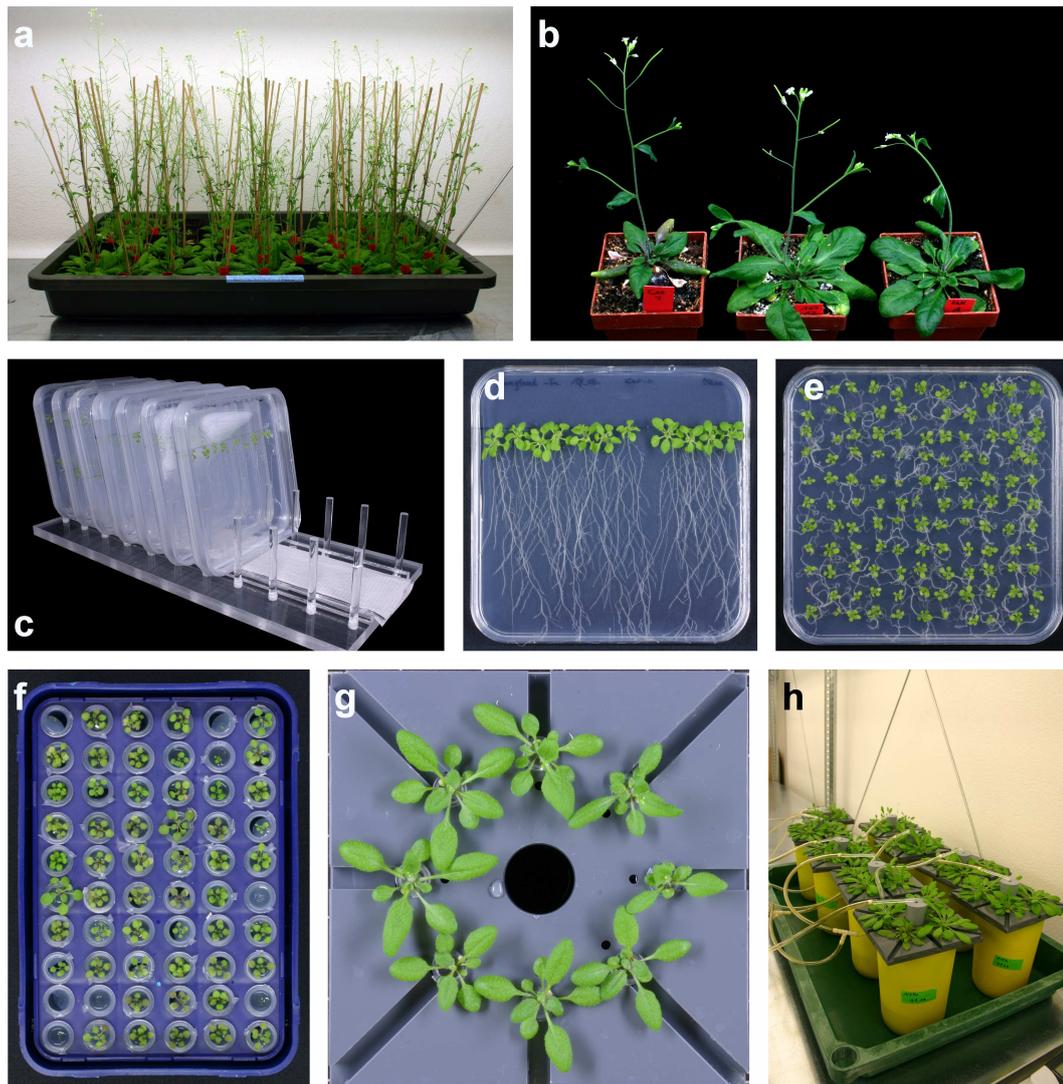


Abbildung 3.2: Anzucht von *A. thaliana*. Dargestellt sind die Anzucht auf Erde (**a + b**), sterile Anzucht im Agarplattensystem (**c–e**) sowie die Anzucht im hydroponischen System (**f–h**). Erläuterungen siehe Text.

Steriles Agarplatten System

Oberflächensterilisierte und stratifizierte Samen wurden auf 12×12 cm Agarplatten mit jeweils 50 mL Hoagland-Festmedium in einer Reihe zu je 12 Samen mit ca. 2 cm Abstand zum oberen Rand ausgelegt. Die geschlossenen Platten wurden mit Parafilm versiegelt und in eigens für diese Arbeit entworfenen Ständern aus Acrylglas in vertikaler, leicht geneigter Position im Pflanzenanzuchtschrank inkubiert (vgl. Abbildung 3.2c + d), so dass ein Wachstum der Wurzeln entlang der Oberfläche des Agars gewährleistet war. Nach 14 Tagen wurden die *Arabidopsis* Keimlinge auf neue, in der Medienzusammensetzung den jeweiligen Stressbedingungen angepasste Agarplatten überführt und je nach Experiment weitere 3 oder 5 Tage inkubiert. Die Anzucht erfolgte in dem Pflanzenanzuchtsschrank unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 21 °C / 8 h Dunkelheit, 19 °C). Die Lichtintensität betrug ca. $150 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$.

Zur Selektion von *nas* T-DNA Mutanten mittels PCR oder aufgrund von Antibiotikaresistenzen wurden oberflächensterilisierte und stratifizierte Samen im Abstand von 1 cm auf 12×12 cm Agarplatten ausgelegt und in horizontaler Lage inkubiert (vgl. Abbildung 3.2e). Für Experimente zur Genotypisierung mittels PCR wurde Hoagland Agar (Minimalmedium) verwendet, während Antibiotika (BASTA: 7,5 mg×mL⁻¹, Kanamycin: 50 µg×mL⁻¹, Sulfadiazin: 11,25 µg×mL⁻¹) zu Gamborg B5 Agar (Vollmedium) gegeben wurde. Nach ca. 2 Wochen Inkubation wurden die Agarplatten ausgewertet bzw. Blattmaterial zwecks DNA Isolation für die Genotypisierung mittels PCR geerntet. Selektierte Pflanzen wurden derart in Erde eingesetzt, dass das Wurzelsystem in eine Vertiefung in die Erde gegeben und dann vorsichtig mit Erde bedeckt wurde.

Hydroponisches System

Die Anzucht von *A. thaliana* im hydroponischen Anzuchtsystem erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden in einer Pipettenbox mit Öffnungen für 1000 µL Pipettenspitzen 0,5 mL Reagiergefäße platziert, deren Böden mit einem heißen Metalldraht ($\varnothing \approx 1$ mm) durchstoßen war. Nach dem Autoklavieren wurden zunächst 100 µL (zwecks Bildung eines Pfropfes) und nach dem Erkalten weitere ca. 600 µL $\frac{1}{4}$ Hoagland Agar (0,6% Agar, ohne Saccharose) vorsichtig in die 0,5 mL Reagiergefäße eingefüllt. Dann wurden die sterilisierten und stratifizierten Samen auf der konvex nach oben gewölbten Oberfläche des Agars ausgelegt, die Pipettenbox mit einem transparenten Deckel verschlossen und mit Parafilm versiegelt (vgl. Abbildung 3.2f). Die darauf folgende Anzucht im Pflanzenanzuchtschrank erfolgte für 14 Tage unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 21 °C / 8 h Dunkelheit, 19 °C). Die Lichtintensität betrug ca. 150 µmol×m⁻²×s⁻¹.

Keimlinge, deren Wurzeln durch die Öffnung im Boden der Reagiergefäße hindurch gewachsen waren, wurden mitsamt den Reagiergefäßen in das pro Behälter ca. 800 mL $\frac{1}{4}$ Hoagland Flüssigmedium (10 µM Fe, ohne Saccharose, autoklaviert) enthaltene hydroponische System umgesetzt. Die Behälter des hydroponischen Systems fassten 8 Pflanzen, waren zum Schutz lichtempfindlicher Bestandteile des Mediums (FeEDTA) lichtgeschützt und zur Durchmischung und Anreicherung mit O₂ mit 2x gefilterter Raumluft über eine Aquariumpumpe belüftet (vgl. Abbildung 3.2h). Das Medium wurde 1x wöchentlich gewechselt, wobei die Behälter zum Schutz vor Kontaminationen jeweils gründlich mit Seifenlauge ausgespült wurden. Nach 14 Tagen Anzucht im hydroponischen System (Entwicklung unter Langtagbedingungen entsprechend Abbildung 3.2g) wurden die Pflanzen in Behältern zu je 4 Pflanzen transferiert. Bei Experimenten, in denen Eisenmangel induziert wurde, wurden die Wurzeln der umzusetzenden Pflanzen zur Austreibung apoplastischer Eisenpools vor dem Umsetzen in 100 mM Ca₂(NO)₃ gewaschen.

Die Anzucht erfolgte in den unter 3.2.1 beschriebenen Pflanzenanzuchträumen unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit) oder Kurztagbedingungen (11 h Licht / 13 h Dunkelheit) bei konstant 21 °C sowie 50–60 % Luftfeuchtigkeit. Die Lichtintensität betrug ca. 110–120 µmol×m⁻²×s⁻¹.

3.2.2 Kreuzung von *A. thaliana*

Homozygote, zu kreuzende *nas* T-DNA Insertionsmutanten wurden wie beschrieben auf Erde angezogen. Nach dem Übertritt in das reproduktive Wachstum wurde zunächst der Primärsproß zurückgeschnitten und durch die Aufhebung der Apikaldominanz der Austrieb mehrerer Blüten tragender Seitensprosse induziert. Um eine Kontamination durch Selbstbestäubung zu unterbinden, wurden aus einer Infloreszenz des weiblichen Kreuzungspartners zunächst alte Blüten mit reifem, ausgeschüttetem Pollen mit einer feinen Pinzette entfernt und die Pinzette umgehend mit 70 % Ethanol gereinigt. Als nächstes wurden unreife Knospen aus der Infloreszenz entfernt, so dass in der Regel 3 Knospen übrig blieben, an deren Spitze bereits die weißen Petalen sichtbar waren. In diesem Entwicklungsstadium ist eine Bestäubung des bereits reifen Karpells möglich, während der Pollen in den Stamina noch unreif und damit eine Selbstbestäubung ausgeschlossen ist. Die selektierten Knospen wurden mit einer feinen Pinzette von Sepalen, Petalen und Stamina befreit, so dass von der Blüte nur noch das Karpell übrig blieb. Von Infloreszenzen des männlichen Kreuzungspartners wurden frisch geöffnete Blüten abgetrennt und der Pollen durch Abstreifen auf dem Karpell des weiblichen Kreuzungspartners platziert. Derart bestäubte Blüten wurden durch Bindfäden markiert und die Pflanzen im Anzuchttraum weiter kultiviert.

2-3 Tage nach der Kreuzung wurde dessen Erfolg in Form des Auswachsens des Karpells zum Fruchtkörper überprüft. Samen der aus Kreuzungen hervorgegangene Sichten wurden separat geerntet und umgehend zu Anzucht der F1 Nachkommen sterilisiert und auf Agarplatten ausgelegt. Mittels PCR identifizierte positive heterozygote F1 Nachkommen wurden geselbstet und homozygote Individuen in der F2 Generation mittels PCR selektiert.

3.2.3 Isolation genomischer DNA (gDNA) für Genotypisierungen

Je ein junges Blatt (ca. 1 cm²) wurde in ein 2 mL Reagiergefäß (Sarstedt Safe-seal) gegeben und nach Zugabe von je 2 Stahlkugeln ($\emptyset \approx 2$ mm) mindestens 1 h bei -80°C eingefroren. Dann wurde das Material in tiefgefrorenem Zustand 30 s mit Hilfe der Retsch Schwingmühle MM2 auf höchster Stufe durch schnelles Schütteln zerkleinert. Nach Zugabe von 400 μL Extraktionspuffer wurde das Material durch 5 s Vortexen homogenisiert und 2 min bei RT inkubiert. Nach 1–2 min Zentrifugation bei $16\,000\times g$ (max. Geschwindigkeit) wurde der Überstand in ein frisches 1,5 mL Reagiergefäß überführt und 300 μL Isopropanol sowie 30 μL 3 M Na-Acetat hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die genomische DNA mindestens 1 h bei -20°C ausgefällt. Nach 15 min Zentrifugation bei $15\,000\times g / 4^{\circ}\text{C}$ (max. Geschwindigkeit), wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 μL eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation, 5 min bei $15\,000\times g / 4^{\circ}\text{C}$, wurde der Überstand verworfen, das Pellet ca. 1 h bei RT getrocknet

und in TE Puffer (pH 7,4; 100–300 μ L, je nach eingesetzter Probenmenge) gelöst. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C, langfristige Lagerung bei –20 °C.

3.2.4 Ernte und Materialaufbereitung von Pflanzenmaterial für weiterführende Analysen

Material aus dem hydroponischen System wurde in einem Porzellanmörser unter strikter N₂-Kühlung grob gemörsert. Das zerkleinerte und homogenisierte Material wurde unter Beibehaltung der Kühlung entsprechend des Verwendungszwecks aufgeteilt. Für die Weiterverarbeitung in der RNA Extraktion wurden ca. 70 mg und für NA Extraktionen je ca. 100 mg Pflanzenmaterial in 2 mL Reagiergefäße (Sarstedt Safe-Seal) eingewogen. Verbliebenes Material wurde zurück in das 50 mL Falcon Röhrchen transferiert und zum Zweck der Bestimmung der Metallgehalte lyophilisiert.

Das Material aus dem vertikalen Agarplatten System wurde ausschließlich für Expressionsstudien verwendet und daher direkt in 2 mL Reagiergefäße seziiert (Blattspreiten und Wurzeln).

In 2 mL Reagiergefäße überführtes Material wurde mittels eines an die Form des Reagiergefäßes angepassten Homogenisatorstabes unter strikter N₂ Kühlung und mehrmaligem Durchmischen gründlich zerkleinert (siehe Abbildung) und bis zur RNA- oder NA-Extraktion bei –80 °C gelagert.



3.3 Bestimmung der Metallgehalte

Für die Bestimmung der Metallgehalte wurde 100 mg homogenisiertes und lyophilisiertes Pflanzenmaterial eingewogen und der Druckaufschluss in 2–3 mL HNO₃ über Nacht bei 185 °C vorgenommen. Derart aufgeschlossenes Material wurde an die Arbeitsgruppe „Anorganische und Analytische Chemie und Radiochemie“ (Prof. Dr. H.P. Beck, Universität des Saarlandes) weitergereicht, die im Rahmen einer Kooperation die Bestimmung der Metallgehalte in den Proben mittels ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) durchgeführt hat.

Ein Teil der Proben (Blätter aus veg. Entwicklungsstadium, sowie Proben aus Blüten, Schoten und Samen) wurden in Kooperation mit Fr. Dr. C. Fink-Straube (Leibniz Institut für neue Materialien, Saarbrücken) mit einem Graphitrohr AAS (AAS 6 vario, solid sampler SSA 61, Analytik Jena AG) analysiert. Bei dieser Analyse war ein Druckaufschluss nicht notwendig. Stattdessen wurde das lyophilisierte Material mit einem Quarz-Mörser sehr fein gemörsert, um eine möglichst homogene Feststoffeinwaage zu ermöglichen. Die Mengenbestimmung erfolgte bei beiden Methoden durch den Vergleich mit authentischem Mengenstandard.

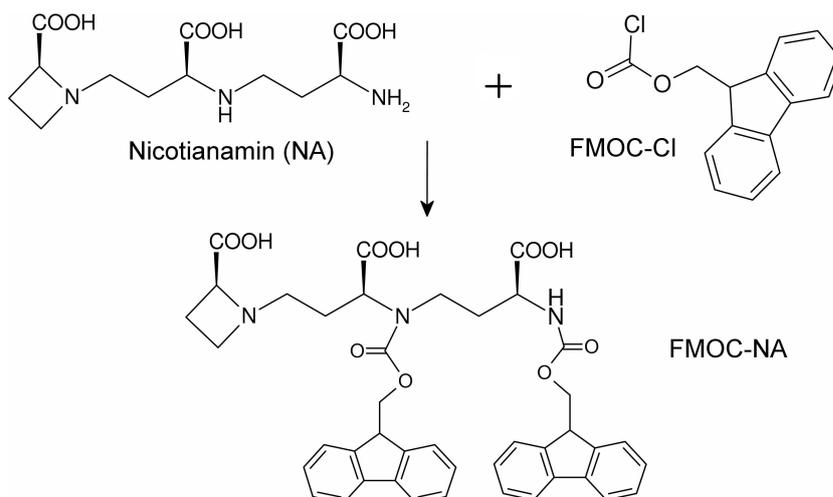


Abbildung 3.3: Derivatisierung von Nicotianamin mittels Fmoc-Cl. Fmoc bindet an primäre und sekundäre Aminogruppen, die im Fall von Nicotianamin wahrscheinlich direkt an der Ausbildung des octahedralen Komplexes beteiligt sind (vgl. Abbildung 1.6).

3.4 Bestimmung der NA Gehalte in Pflanzenextrakten

Die Bestimmung von NA Gehalten in Pflanzenextrakten erforderte zunächst die Entwicklung einer geeigneten analytischen Messmethode. Um eine Bewertung und Beurteilung der mit dieser neuen Methode erzielten Messergebnisse zu ermöglichen, werden in Abschnitt 3.4.1 zunächst die wesentlichen Ergebnisse der Etablierung dieser Methode erläutert. Die Beschreibung der einzelnen technischen Details der Methode erfolgt dann in Abschnitt 3.4.2.

3.4.1 Etablierung der NA Quantifizierung mittels HPLC

Die bis zu Beginn der Arbeiten genutzte Methode zur Analyse von NA Gehalten aus Pflanzenextrakten basierte auf der Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion mittels Ninhydrin [Schmidke und Stephan (1995)]. Da bei dieser Methode die Derivatisierung jedoch erst nach der Auftrennung mittels HPLC erfolgte, war durch die notwendige Verdünnung die Sensitivität der Methode relativ gering. Durch die Absicht, in der vorliegenden Arbeit möglichst auch geringe Konzentrationen und Konzentrationsunterschiede sicher bestimmen zu können, ergab sich die Notwendigkeit der Etablierung einer neuen Methode mit gesteigerter Sensitivität.

Als nicht-proteinogene Aminosäure eigneten sich für die Messung von NA prinzipiell sämtliche Methoden aus der allgemeinen Aminosäureanalytik, deren Derivatisierungs Reagenzien an Aminogruppen binden. Fmoc-Cl (9-Fluorenyl-methoxy-carbonyl-chlorid) ist ein in der Aminosäureanalytik gängiges Derivatisierungs Reagenz [Einarsson et al. (1983)] und bindet sowohl primäre als auch sekundäre Aminogruppen (vgl. Abbildung 3.3). Am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle, AG Metallhomöostase

(PD Dr. S. Clemens) wurde Fmoc-Cl bereits in der NA Analytik unter Nutzung eines modifizierten Protokolls nach [Gustavsson und Betnér (1990)] eingesetzt. Allerdings wurde Fmoc-Cl dort nur zur Auftrennung mittels einer Umkehrphasen-HPLC genutzt. Die Detektion erfolgte aber nicht wie üblich über die Fluoreszenz des Derivats, sondern durch den Einsatz eines kostenintensiven Massenspektrometers. Die Schwierigkeit in der Fluoreszenz basierten NA Quantifikation bestand nämlich darin, dass NA mit je einer primären und einer sekundären Aminogruppe scheinbar auch unvollständig derivatisiert werden konnte. Dieses äußerte sich in bis zu drei NA spezifischen, aber im Bezug auf die Größenverteilung variabel verteilten NA Peaks nach der Auftrennung. In Ermangelung eines Massenspektrometers war demnach eine weitere Optimierung der Methode erforderlich, um die NA Quantifizierung mit einem Fluoreszenzdetektor vornehmen zu können. Die wesentlichen Schritte zur Etablierung der Methode werden in der Folge dargestellt.

3.4.1.1 Auftrennung und Nachweis von NA

Zunächst wurde die HPLC Methode der AG Metallhomöostase (IPB Halle) unter Nutzung eines Fluoreszenzdetektors adaptiert. Es konnte gezeigt werden, dass aus derivatisiertem synthetischen NA Standard ein einzelner gut aufgetrennter NA Peak bei einer Retentionszeit von ca. 16,5 min detektiert wurde (vgl. Abbildung 3.4a). Dieser in der negativ Kontrolle (derivatisiertes H₂O) erwartungsgemäß fehlende NA Peak konnte auch in Pflanzenextrakten aus Tomate Wild Typ (Sorte Bonner Beste) identifiziert werden. Durch das Fehlen des Peaks in Pflanzenextrakten aus der NA freien Tomatenmutante *chloronerva* konnte weiter gezeigt werden, dass es sich bei dem NA Peak in Pflanzenextrakten mit hoher Wahrscheinlichkeit um authentisches NA handelte. Um die Quantifizierbarkeit der Methode zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe aus synthetischem NA Standard von 10 bis 0,625 pmol pro Injektion derivatisiert und aufgetrennt. Die daraus resultierende Eichgerade (vgl. Abbildung 3.4b) zeigte eine hohe Korrelation zwischen NA Menge und Fluoreszenzintensität im relevanten Konzentrationsbereich auch unterhalb von 1 pmol pro Derivat.

3.4.1.2 Optimierung der Derivatisierungseffizienz

In vorangehenden Versuchen wurde beobachtet, dass die Derivatisierungseffizienz von NA aus Pflanzenextrakten bei Zugabe des Chelators EDTA (1,24 nmol pro 10 µL Derivat) deutlich gesteigert werden konnte. Da EDTA ebenso wie NA eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen besitzt, wurde angenommen, dass diese Steigerung der Derivatisierungseffizienz auf eine Konkurrenz der beiden Chelatoren um die Bindung der Metallionen im Pflanzenextrakt beruhte. Dieser Annahme lag insbesondere die Überlegung zugrunde, dass die Beteiligung der zu derivatisierenden Aminogruppen des NA an der Metallbindung die Derivatisierungseffizienz negativ beeinflussen könnte.

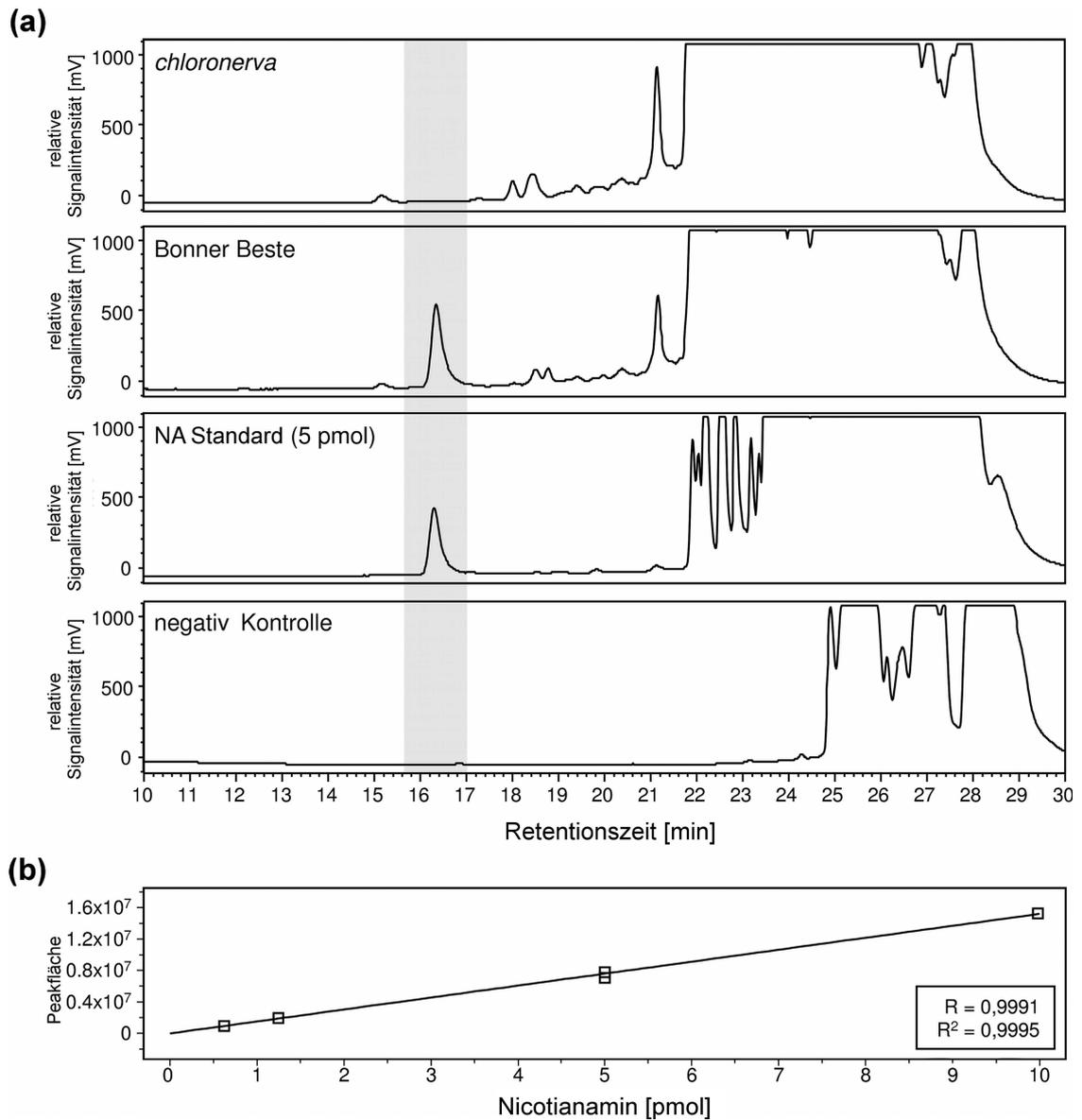


Abbildung 3.4: Separation und Detektion von NA mittels HPLC. **(a)** Synthetischer NA Standard ergab einen NA Peak bei einer Retentionszeit von ca. 16,5 min (grau unterlegt) und konnte in Pflanzenextrakt aus Tomate Wild Typ (Bonner Beste) reproduzierbar dargestellt werden. Die Authentizität des NA im Pflanzenextrakt im Wild Typ wurde durch das Fehlen dieses Peaks in der NA freien Tomatenmutante *chloronerva* gezeigt. Signale mit einer Retentionszeit >22 min sind auf schlecht aufgetrennte Aminosäuren sowie auf im Zuge der Derivatisierung entstandenem Fmoc-OH zurück zu führen. **(b)** Die Eichgerade aus NA Standards mit 0,625, 1,25, 5 und 10 pmol Nicotianamin pro Injektion zeigt ein hohes Maß an Linearität für die Quantifizierung von NA.

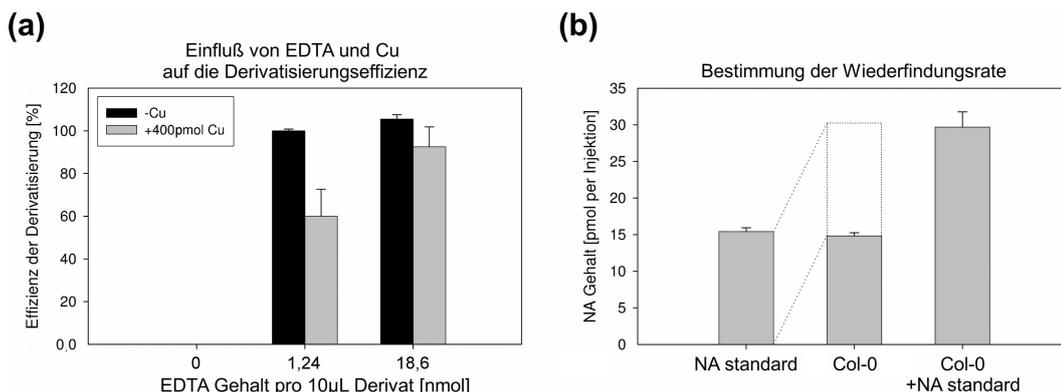


Abbildung 3.5: Etablierung der NA Bestimmung mittels HPLC. **(a)** Einfluss von Metallionen und EDTA auf die Effizienz der NA Derivatisierung im Verhältnis zu der Derivatisierung mit 1,24 pmol EDTA (= 100 %). Je 2 pmol NA wurden mit ohne ohne Zusatz von Cu Ionen und unterschiedlichen Mengen des Chelators EDTA derivatisiert (n = 2). **(b)** Bestimmung der Wiederfindungsrate in der NA Extraktion.

Um die Effizienz beurteilen zu können, mit der EDTA mit NA um gebundene Metallionen konkurriert, wurde zunächst CuCl_2 in Überschuss zu synthetischem NA gegeben (400 pmol CuCl_2 : 2 pmol NA pro 10 µL Derivat). Da Cu(II) unter den zweiwertigen Metallionen die größte Affinität zu NA besitzt (vgl. Tabelle 1.1 auf Seite 25), wurden somit geeignete experimentelle Bedingungen geschaffen, um die für eine vollständige Derivatisierung des NA notwendige Menge an EDTA zu bestimmen. Weiter übertraf der eingesetzte Cu Überschuss reale Metallkonzentrationen in Pflanzenextrakten aus *A. thaliana* um weit mehr als das 1000fache ($\text{Cu} \approx 5\,800\text{x}$, Fe , Mn & $\text{Zn} \gtrsim 1000\text{x}$; Berechnungen nach [Waters et al. (2006)]), wodurch der zu etablierenden Methode ausreichend Robustheit auch im Bezug auf den Einfluss von Metallhyperakkumulation verliehen wurde,

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an EDTA (0, 1,24 und 18,6 nmol pro 10 µL Derivat) mit anschließender Derivatisierung und HPLC Analyse wurde schließlich die Effizienz der Derivatisierungen im Verhältnis zu Standardbedingungen (1,24 nmol EDTA pro 10 µL Derivat, -Cu) bestimmt (vgl. Abbildung 3.5a). Dabei erwies sich die Zugabe von EDTA für die Derivatisierung von NA tatsächlich als essentiell, da ohne EDTA Zugabe kein NA detektiert werden konnte. In nicht mit CuCl_2 versetzten Proben bewirkte die Erhöhung der Standard EDTA Konzentration von 1,24 nmol auf 18,6 nmol (15x) eine geringfügige Erhöhung der detektierten NA Menge um ca. 5%. Im Gegensatz dazu bewirkte die Erhöhung der EDTA Konzentration in mit CuCl_2 versetzten Proben eine deutliche Erhöhung von 60% auf 93% im Vergleich zu den Standardbedingungen.

Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass Metallionen die Derivatisierung von NA negativ beeinflussen und dass eine vergleichende Quantifizierung von NA, speziell in Pflanzenextrakten mit ggf. unterschiedlichen Metallgehalten, beeinflusst werden könnte. Gleichzeitig wurde mit der Zugabe von EDTA ein angemessenes Mittel gefunden, diesem Effekt entgegen zu wirken. Angesichts des im Vergleich zu Pflanzenextrakten sehr hohen Überschusses an Cu, wurde die durch EDTA Zugabe deutliche, aber nicht komplette Kompensation des Cu Einflusses auf die NA Derivatisierung als Indiz gewertet, dass

unter diesen experimentellen Bedingungen in Pflanzenextrakten eine vollständige Derivatisierung des NA gewährleistet ist. Dennoch wurde in den folgenden Experimenten die EDTA Konzentration im Derivatisierungsansatz noch einmal um den Faktor 10 auf nunmehr 186 nmol pro 10 μ L Derivat erhöht.

3.4.1.3 Validierung der NA Extraktionsmethode

Neben der Derivatisierungseffizienz spielte auch die Güte der NA Extraktion eine entscheidende Rolle in der Beurteilung der Analyseverfahren. Unter den getesteten Extraktionsmethoden erwies sich eine modifizierte Methode nach [Neumann et al. \(1999\)](#) als besonders effizient. Um den Verlust von NA im Zuge der Extraktion abschätzen zu können, wurde homogenisiertes Blattmaterial aus Wild Typ (Col-0) in gleiche Teile zu je 100 mg aufgeteilt und die Hälfte dieser Pflanzenproben mit einer definierten Menge synthetischem NA Standard versetzt. Die Pflanzenextrakte wurden in der Folge parallel zu Referenzproben, die die gleiche Menge synthetischem NA wie zuvor zugesetzt enthielten, aber nicht durch die Extraktionsmethode behandelt waren, derivatisiert und mittels HPLC der NA Gehalt quantifiziert. Die vor der Extraktion den Pflanzenproben zugesetzte Menge NA entsprach mit 14,8 pmol in etwa der Menge an endogenem NA aus dem Pflanzenmaterial (15,4 pmol, vgl. [Abbildung 3.5b](#)). Eine verlustfreie NA Extraktionsmethode im Fall der mit NA versetzten Pflanzenproben hätte demnach eine Summierung von exogenem und endogenem NA und damit eine Gesamtmenge von 30,2 pmol NA ergeben müssen. Tatsächlich ergab die Quantifizierung dieser Proben einen NA Gehalt von durchschnittlich 29,7 pmol, woraus sich eine nahezu optimale Wiederfindungsrate von $98\% \pm 7\%$ errechnet. Es konnte demnach gezeigt werden, dass die angewandte NA Extraktionsmethode eine weitgehend vollständige Extraktion und damit Quantifikation von NA aus Pflanzenextrakten ermöglicht.

3.4.2 Technische Beschreibung der Methoden zur NA Analyse

In diesem Abschnitt werden die technischen Details der NA Analyse von der Extraktion über die Derivatisierung und HPLC-Auftrennung bis hin zur Datenanalyse beschrieben.

3.4.2.1 Extraktion von Nicotianamin

Die Extraktion von NA aus zerkleinertem Pflanzenmaterial oder Samen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach [[Neumann et al. \(1999\)](#)].

Zu 100 mg gründlich zerkleinertem Pflanzenmaterial (20 mg Samen, Aufarbeitung entsprechend [3.2.4](#)) wurden je 1 mL reines H₂O (Sigma W4502) gegeben, 20 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 10 s durch Vortexen gründlich gemischt. Nach 15 min Inkubation im Ultraschallbad und erneutem Vortexen für 10 s erfolgte die Abtrennung von festen Bestandteilen in zwei Zentrifugationsschritten. Grobe Bestandteile

wurden zunächst durch 20 min Zentrifugation ($15\,000\times g$, max. Geschwindigkeit / 4°C) abgetrennt. Nach Überführen von $900\ \mu\text{L}$ Überstand in ein frisches Reagiergefäß erfolgte die Abtrennung feiner Partikel durch weitere 40 min Zentrifugation ($15\,000\times g$ / 4°C). $750\ \mu\text{L}$ Überstand wurden in ein frisches Reagiergefäß überführt und der Extrakt bei -80°C aufbewahrt.

3.4.2.2 Derivatisierung der Probe

Die Derivatisierung von NA aus Pflanzenextrakt beruhte auf einer modifizierte Methode nach [Gustavsson und Betnér (1990)], in der Fmoc-Cl mit den beiden Aminogruppen des Nicotianamin reagiert und dieses Derivat nach der der Auftrennung fluorimetrisch detektiert wurde.

$25\ \mu\text{L}$ NA Extrakt wurden zu $75\ \mu\text{L}$ Derivatisierungs Puffer in ein lichtgeschütztes Reagiergefäß gegeben. Durch Zugabe von $50\ \mu\text{L}$ Fmoc-Cl, gründlichem Mischen durch Vortexen, Herunterschleudern der Tropfen sowie 45 s Inkubation bei RT wurde der Pflanzenextrakt derivatisiert. Überschüssiges Fmoc wurde durch die Zugabe von $50\ \mu\text{L}$ ADAM, erneutem Vortexen, Herunterschleudern sowie 45 s Inkubation bei RT präzipitiert. Die Abtrennung des Präzipitats erfolgte in zwei Zentrifugationsschritten. Zunächst wurden durch 20 min Zentrifugation ($15\,000\times g$, max. Geschwindigkeit / 4°C) die groben Bestandteile abgetrennt. Nach Überführen von $150\ \mu\text{L}$ Überstand in ein frisches Reagiergefäß erfolgte die Abtrennung der restlichen Partikel durch weitere 40 min Zentrifugation ($15\,000\times g$ / 4°C). $100\ \mu\text{L}$ Überstand wurden schließlich direkt in ein LVI Autosamplerröhrchen aus Glas überführt und in den auf 12°C gekühlten Waters 717 plus Autosampler der HPLC Anlage geladen.

3.4.2.3 Chromatographische Trennung und Quantifizierung des derivatisierten NA Extrakts

Die Auftrennung von je $10\ \mu\text{L}$ derivatisiertem NA Extrakt erfolgte über eine an einem Waters 600E HPLC System angeschlossene RP Kieselgelsäule. Nach Equilibrierung der Säule erfolgte die Auftrennung der Probe in einem linearen Gradienten entsprechend Tabelle 3.3, wobei der Säulendruck im Bereich von 1000 PSI (100 % A) bis 2000 PSI (100 % B) lag. Aufgetrenntes NA wurde mit dem Fluoreszenzdetektor (Einstellungen: Anregung (Ex) = $263\ \text{nm}$, Emission (Em) = $313\ \text{nm}$, Gain = 100, Attenuation = 1, Response = FST, Mode = Norm) detektiert und anhand einer zuvor aufgenommenen Standardkurve mit derivatisiertem synthetischem NA quantifiziert. Die Quantifizierung und Datenanalyse wurde mit der zur HPLC Anlage gehörenden Millennium³² Software durchgeführt.

Tabelle 3.3: Darstellung des HPLC Gradienten zur Auftrennung von derivatisiertem Nicotianamin Extrakt. A = 80 % Na-Acetat Puffer, 20 % Acetonitril. B = 20 % Na-Acetat Puffer, 80 % Acetonitril.

Zeit [min]	Flußrate [mL×min ⁻¹]	A [%]	B [%]	Gradient
0	1	100	0	6 (linear)
5	1	100	0	6
15	1	80	20	6
20	1	0	100	6
22	1	0	100	6
23	1	100	0	6
30	1	100	0	6

3.5 Expressionsanalysen

Die Quantifizierung von mRNA in Gewebeproben zum Zweck der Aufklärung regulatorischer Effekte auf Ebene der Genexpression zählt zu den wichtigsten Werkzeugen der Molekularbiologie. Neben der direkten Quantifizierung der RNA über Northern Hybridisierung hat sich seit Anfang der 1990er Jahre die sensitivere, semi-quantitative RT-PCR zur Quantifizierung niedrig exprimierter mRNA Level etabliert [Weis et al. (1992)].

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die semi-quantitative RT-PCR genutzt, die in Abschnitt 3.5.1 beschrieben wird. Aus Gründen der Sensitivität und Vergleichbarkeit der Expressionsdaten wurde diese Methode dann durch die Etablierung eines sehr robusten Protokolls der real-time RT qPCR ersetzt, die in Abschnitt 3.5.2 beschrieben wird.

3.5.1 Expressionsanalyse mit der semi-quantitativen RT-PCR

Gesamt RNA wurde aus ca. 70 mg aufbereitetem Pflanzenmaterial mit dem Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek) entsprechend den Vorgaben des Herstellers isoliert. Je 0,5 - 1 µg RNA wurden entsprechend einem kombinierten Protokoll der Firma Fermentas zunächst 30 min zur Entfernung von genomischer DNA mit DNase I (Fermentas) behandelt und, nach Inaktivierung der DNase I, unter Verwendung einer M-MuLV[H⁻] reversen Transkriptase (Fermentas) und Oligo(dT)₁₈ Primern in cDNA umgeschrieben .

1 µL der 1:5 verdünnten cDNA diene als Template in der anschließenden semi-quantitativen PCR. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung Gen spezifischer Primer in einem Ausgangsvolumen von 60 µL mit 1 U Taq DNA Polymerase (TaKaRa Ex Taq). Nach 20 und 25 PCR Zyklen wurden jeweils 20 µL Probenvolumen entnommen und die PCR Reaktion mit dem verbliebenen Volumen fortgesetzt. Unter Berücksichtigung der Intensitäten der konstitutiv exprimierten internen Kontrolle, Elongationsfaktor *EF1B α 2*, wurden Unterschiede in der ursprünglichen Gesamt-cDNA-Konzentration durch Auftragen angepasster Volumina der jeweiligen Probe auf das 1,5%ige Agarosegel ausgeglichen. Nach der Auftrennung durch Agarose Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der PCR Produkte mittels Southern Hybridisierung und Quervernetzung durch Backen bei

80 °C auf eine Hybond N⁺ Nylonmembran (Amersham). Die Hybridisierung wurde entsprechend [Church und Gilbert \(1984\)](#) mit spezifischen, [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP markierten Hybridisierungsproben durchgeführt. Hybridisierungssignale wurden an einem Phosphoimager (BAS 3000, Fujifilm) detektiert.

3.5.2 Expressionsanalyse mittels real-time qPCR

Nachteile der vorgenannten semi-quantitativen RT-PCR sind u. a. die relativ unpräzise Abschätzung der Intensitäten von Hybridisierungsbanden sowie die nicht vorhandene Vergleichbarkeit der Expressionsintensitäten unterschiedlicher Gene. Aus diesem Grund wurde ein anspruchsvolles Protokoll zur Durchführung der real-time RT qPCR, basierend auf SYBR green I Detektion sowie absoluter Quantifizierung unter Verwendung von Massenstandards, etabliert.

In diesem Abschnitt werden die zum Verständnis und der Bewertung der Methode notwendigen experimentellen Schritte erläutert. Darüber hinaus gehende Informationen in Form von sehr detaillierten, schrittweisen Protokollen sind in [[Klatte und Bauer \(2008\)](#)] nachzulesen. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden mit den real-time qPCR Systemen Mx3000P (Stratagene) sowie MyiQ (Bio-Rad) generiert, ursprünglich etabliert wurde das System jedoch an einem iCycler iQ (Bio-Rad) System.

3.5.2.1 Etablierung der real-time RT qPCR

Primer Design

Spezifische PCR Primer für die real-time RT qPCR wurden mit der Software Primer Express (Applied Biosystems) entworfen. Parameter für das Primer Design waren: 17-23 bp Länge, GC-Gehalt von 40-60% und eine Schmelztemperatur T_m von 54-56 °C, die damit 2-4 °C unterhalb der Annealing Temperatur in der PCR lag. Bei der cDNA Synthese wurden Oligo(dT)₁₈ Primer verwendet, um ausgehend vom Poly-A Ende selektiv mRNA in cDNA umzuschreiben. Die real-time qPCR Primer wurden dem entsprechend so entworfen, dass sie möglichst Bereiche im dem Poly-A Ende nahe gelegene 3'-Ende der cDNA amplifizierten. Die Positionen der für die Amplifikation von *NAS* Transkript entworfenen Primer im Kontext der Gensequenzen sind in [Abbildung A.2](#) im Anhang dargestellt. Die Größe der Amplicons betrug jeweils 80-150 bp.

Da die *NAS* Gene keinerlei Introns besaßen, war ein die Amplifikation von Kontaminationen genomischer DNA sicher ausschließendes Primer Design nicht möglich. Um den Einfluss dieser Kontaminationen dennoch ausschließen zu können, wurden zwei real-time qPCR Primer Paare für das konstitutiv exprimierte Standardgen *EF1Balpha2* entworfen. Eines dieser Primer Paare diente der gewöhnlichen Amplifikation von cDNA, das andere Primer Paar wurde jedoch so entworfen, dass ausschließlich genomische DNA

amplifiziert wurde. Durch absolute Quantifizierung, also die Bestimmung von anfänglichen absoluten Templatemengen anhand einer Standardkurve, konnte somit die absolute Kontamination an genomischer DNA pro Probe festgestellt und von den Messwerten der *NAS* Gene subtrahiert werden.

Zur Generierung von Massenstandards für die real-time RT qPCR wurde ein weiteres Primer Paar entworfen, das jeweils einen ca. 1 kb großen, die Primer Annealing Positionen der Quantifizierungsprimer einschließenden Abschnitt der jeweiligen Gensequenz umfasste. Als Template für die Generierung der Massenstandards diente in der Regel cDNA. Im Fall der *NAS* Gene, deren hochgradig homologe Gensequenzen eine absolut spezifische Amplifikation erschwerten, wurde auf BAC Klone (*NAS1*, *NAS3* & *NAS4*) sowie auf den durch Sequenzierung verifizierten cDNA Klon pENTR-Atnas5b-17 (*NAS2*) zurückgegriffen.

Die Spezifität sämtlicher entworfener Primer wurde durch BLASTN Vergleiche gegen die AGI Transkript (–Introns, + UTRs) und die AGI Gesamt-Genom Datenbanken von *A. thaliana*, verfügbar auf der TAIR Internetpräsenz [[TAIR - The Arabidopsis Information Ressource](#)], verifiziert. Um eine homogene Zusammensetzung und damit Spezifität der Primer zu gewährleisten, wurden diese stets in HPLC aufgereinigter Form bestellt. Eine Tabelle sämtlicher verwendeter real-time qPCR Primer befindet sich in Abschnitt 3.1.3.

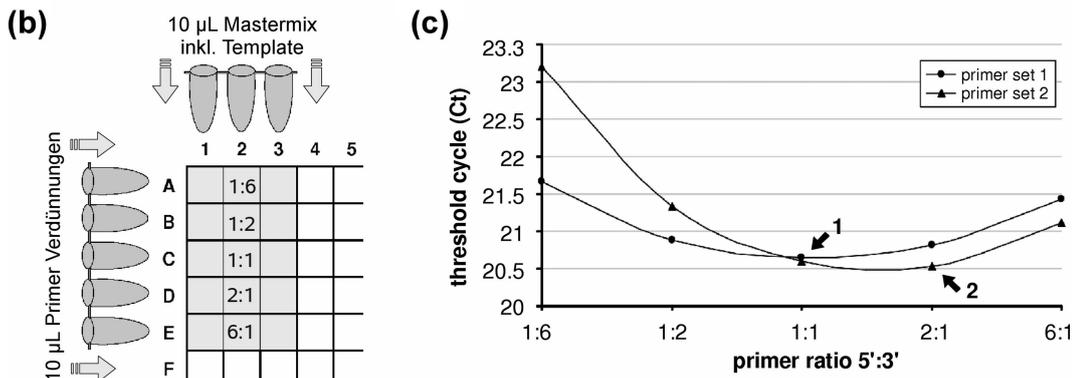
Generierung von Massenstandards

In einer PCR mit einer maximalen Zahl von 30–35 Amplifikationszyklen wurden die ca. 1 kb großen Amplicons generiert. Nach Auftrennung durch ein 1%iges Agarosegel wurden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek) entsprechend den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Aufgereinigte DNA wurde in der Regel in mehreren Verdünnungsstufen mittels UV-Spektroskopie, und parallel dazu über Gelelektrophorese und Verwendung eines Massenstandards, semi-quantitativ abgeschätzt. Lediglich die Standards der zum Ende der Arbeit etablierten PCR auf *YSL* Transkript wurden auf eine andere Art und Weise quantifiziert. Entsprechend dem Protokoll von [[Bonasera et al. \(2007\)](#)] erfolgte die Quantifizierung dieser Standards anhand einer Eichkurve auf der Basis von Mengenstandards in Form von verdünnter λ DNA (Sigma). Durch Anfärbung der DNA mit dem Interkalator Ethidiumbromid sowie dessen spektrofluorimetrische Detektion war eine Quantifizierung mit deutlich höherer Sensitivität und Präzision möglich.

Durch Bestimmung der korrekten Molmasse der Amplicons (z. B. durch [[IDT - Oligo Analyzer](#)]) konnte die absolute Zahl an DNA Molekülen pro Volumen bestimmt und durch Verdünnung mit hochreinem Wasser (Sigma) auf 10^9 Moleküle pro 10 μ L eingestellt werden. Es folgte eine Verdünnungsreihe in je 1:10 Schritten (100 μ L DNA + 900 μ L H₂O) auf 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 DNA Molekülen pro 10 μ L. Je 30 μ L dieser Verdünnungen wurden in leicht wieder zu öffnende 200 μ L PCR Streifen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Das Aufteilen der Standards in kleine Volumina war notwendig, um einer DNA

(a)

Primer Verdünnungen		A	B	C	D	E
1 mM Primer stocks mit	primer 5'	4 μ L	8 μ L	12 μ L	16 μ L	24 μ L
	primer 3'	24 μ L	16 μ L	12 μ L	8 μ L	4 μ L
H ₂ O mischen	H ₂ O	12 μ L	16 μ L	16 μ L	16 μ L	12 μ L
Primer Verhältnis 5' : 3' [nM]		1:6	1:2	1:1	2:1	6:1
		50:300	100:200	150:150	200:100	300:50



Primer Matrix - Selektion der Primer Kombination

- mit dem niedrigsten Ct (=höchste Effizienz)
- mit der geringsten Primer Konzentration
- Bestätigung der Spezifität über Analyse der Dissoziationskurve

Abbildung 3.6: Primer Optimierung in der real-time qPCR durch die verkürzte Primer Matrix. **(a)** Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Primer Verdünnungen mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen. **(b)** Pipettierschema der Primermatrix. Es wurden jeweils 3 technische Wiederholungen je Primer Konzentrationsverhältnis durchgeführt. **(c)** Auftragung der Ct Werte als Maß der PCR Effizienz in Abhängigkeit der Primer Konzentrationsverhältnisse. Die jeweils optimalen Verhältnisse sind in zwei Beispielen mit Pfeilen gekennzeichnet.

Degradierung der DNA Massenstandards durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu unterbinden und damit eine Vergleichbarkeit der Quantifizierungen unterschiedlicher PCR Läufe zu gewährleisten.

Optimierung der real-time PCR

Ein wichtiger Aspekt in der SYBR green I basierten real-time RT qPCR stellte die Minimierung der Bildung von unspezifischen PCR Produkten dar. Die maximal mögliche Spezifität unter Wahrung einer optimalen PCR Effizienz wurde durch eine Reduktion der Primerkonzentrationen erreicht. In der so genannten verkürzten Primer Matrix wurden zu diesem Zweck unterschiedliche Kombinationen an Primerkonzentrationen im Konzentrationsbereich von 50 nM bis 300 nM eingesetzt und die jeweilige Effizienz der PCR Reaktionen anhand eines möglichst niedrigen Ct beurteilt (vgl. Abbildung 3.6). Bei gleicher PCR Effizienz wurde das Primer Konzentrationsverhältnis ausgewählt, bei dem möglichst niedrige Primerkonzentrationen eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der Primer Titration

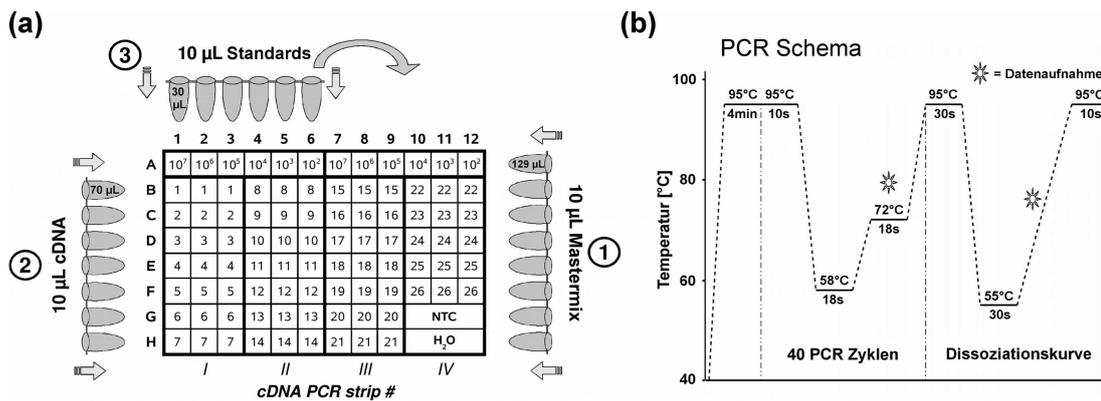


Abbildung 3.7: Experimentelles Design der real-time qPCR. **(a)** Aufteilung und Pipettierschema einer 96 well PCR Platte, hier mit technischen Triplikaten der cDNA Proben. Für jeden Schritt wurde eine 8-Kanal 10 µL Pipette verwendet. ① Auftrag von 10 µL Mastermix in Richtung 12 → 1. ② Auftrag von 10 µL cDNA Probe in Richtung 1 → 12. ③ Auftrag des Massenstandards in A1-A6 und A7-A12. NTC = non-template control. **(b)** Schematische Darstellung des PCR Programms.

zusammenfassend, erwies sich bei der Mehrheit der getesteten Primer Paare ein equimolares Konzentrationsverhältnis von 150 nM : 150 nM (5' : 3') als optimal. Lediglich bei *NAS2* (100 nM : 150 nM) sowie *NAS3* und *NAS4* (je 150 nM : 100 nM) erwies sich ein ungleiches Konzentrationsverhältnis als optimal.

3.5.2.2 Probenaufarbeitung und experimentelles Design

Die RNA Extraktion und cDNA Synthese erfolgte im wesentlichen wie unter Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Abweichend davon wurde die cDNA zunächst 1:10 verdünnt und in dieser Verdünnungsstufe bei -20 °C gelagert.

Das auf maximale Präzision und ökonomische Effizienz optimierte experimentelle Design wird in der Folge näher erläutert und ist zur Veranschaulichung in Abbildung 3.7 dargestellt. Um ein möglichst positives Zahlenverhältnis zwischen Proben und Massenstandards zu erreichen, wurde pro analysiertem Gen je eine möglichst vollständige belegte 96-well PCR Platte verwendet. Dabei diente die oberste Reihe einer PCR Platte (A1 – A12) der Aufnahme von zwei technischen Replikaten der Massenstandards, die aus einem 6 Tube PCR Streifen in zwei Pipettierschritten mit einer 8-Kanal Pipette aufgetragen wurden. Die verbliebenen 84 wells der PCR Platte fassten 26 unterschiedliche cDNA Proben zuzüglich Negativ- (NTC) und Wasserkontrolle bei technischen Triplikaten.

Einen wichtigen Aspekt der vorgestellten Methode stellte die Aufteilung des PCR Volumens in 10 µL Mastermix + 10 µL Template dar. Durch das relativ hohe Pipettier Volumen des Templates wurde eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Methode erreicht, was eine Reduktion der technischen Replikate auf jeweils zwei Reaktionen ermöglichte. Daher war in der Regel eine parallele Untersuchung von bis zu 40 cDNA Proben pro PCR Platte möglich.

Neben den interessierenden Genen der Metallhomöostase wurden zwei wahrscheinlich konstitutiv exprimierte Kontrollgene *EF1Balpha2* (Elongationsfaktor bei der Translation) und *UBP6* (Ubiquitin spezifische Protease 6) quantifiziert. Die Auswahl dieser Gene erfolgte anhand konstitutiver Expressionsmuster in Microarray Datenbanken. Dabei war von besonderer Wichtigkeit, dass die ausgewählten Kontrollgene getrennten Stoffwechselwegen angehörten. Durch diese Maßnahme wurde sichergestellt, dass ein unwahrscheinlicher, aber dennoch nicht auszuschließender regulatorischer Einfluss der experimentellen Bedingungen auf einen dieser Stoffwechselwege, also eine unerwartet nicht-konstitutive Expression eines der Kontrollgene, identifiziert werden konnte. Wie sich jedoch herausstellte, waren beide Kontrollgene in sämtlichen Experimenten in hohem Maße gleich exprimiert.

3.5.2.3 Validierung und Auswertung der real-time qPCR

Bei jedem real-time RT qPCR Experiment wurde die Qualität und Integrität jeder einzelnen PCR Reaktion sorgfältig überprüft. Dieses wurde zum einen durch Überprüfung der Reproduzierbarkeit der technischen Replikate erreicht, bei der eine Abweichung von max. 1 Ct zwischen den Replikaten akzeptiert wurde. Durch das Pipettieren von 10 µL Template wurde jedoch in der Regel eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht (vgl. Abbildung 3.8a). Durch die Verwendung von Massenstandards war die Bestimmung der PCR Effizienz als Maß der Qualität des PCR Laufs in jedem Experiment möglich. Akzeptiert wurden Effizienzen im Bereich von 90 % – 110 %. (vgl. Abbildung 3.8b). Zur Überprüfung der PCR Spezifität wurden im Anschluss jeder PCR die Denaturierungseigenschaften jeder Probe durch schrittweise Temperaturanhebung und gleichzeitiger Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitäten festgestellt (vgl. Abbildung 3.7b). Da die Denaturierungstemperatur von Länge und Zusammensetzung einer DNA Sequenz abhängt, konnten somit Proben identifiziert und aussortiert werden, in denen neben dem erwünschten PCR Produkt auch weitere, unspezifische Produkte das Ergebnis der SYBR green I basierten Quantifizierung beeinflusst hatten (vgl. Abbildung 3.8c).

3.5.2.4 Auswertung der real-time qPCR

Die Auswertung der real-time qPCR Resultate erfolgte manuell nach Übertragung der absoluten Expressionsdaten in Microsoft Excel. Dort wurden zunächst mögliche Mengen an Kontaminationen aus der H₂O Kontrolle und genomischer DNA (*EF1Balpha2*, genom. DNA - vgl. Abschnitt 3.5.2.1) von den Expressionsdaten subtrahiert. Es folgte die Bestimmung der Normalisierungsfaktoren anhand der Auswertung der beiden konstitutiv exprimierten Kontrollgene *EF1Balpha2* und *UBP6*. Diese dem Ausgleich von Unterschieden in der Gesamt cDNA Konzentration der Proben dienende Normalisierung beruhte auf der Annahme, dass die Expressionslevel von konstitutiv exprimierten Kontrollgenen

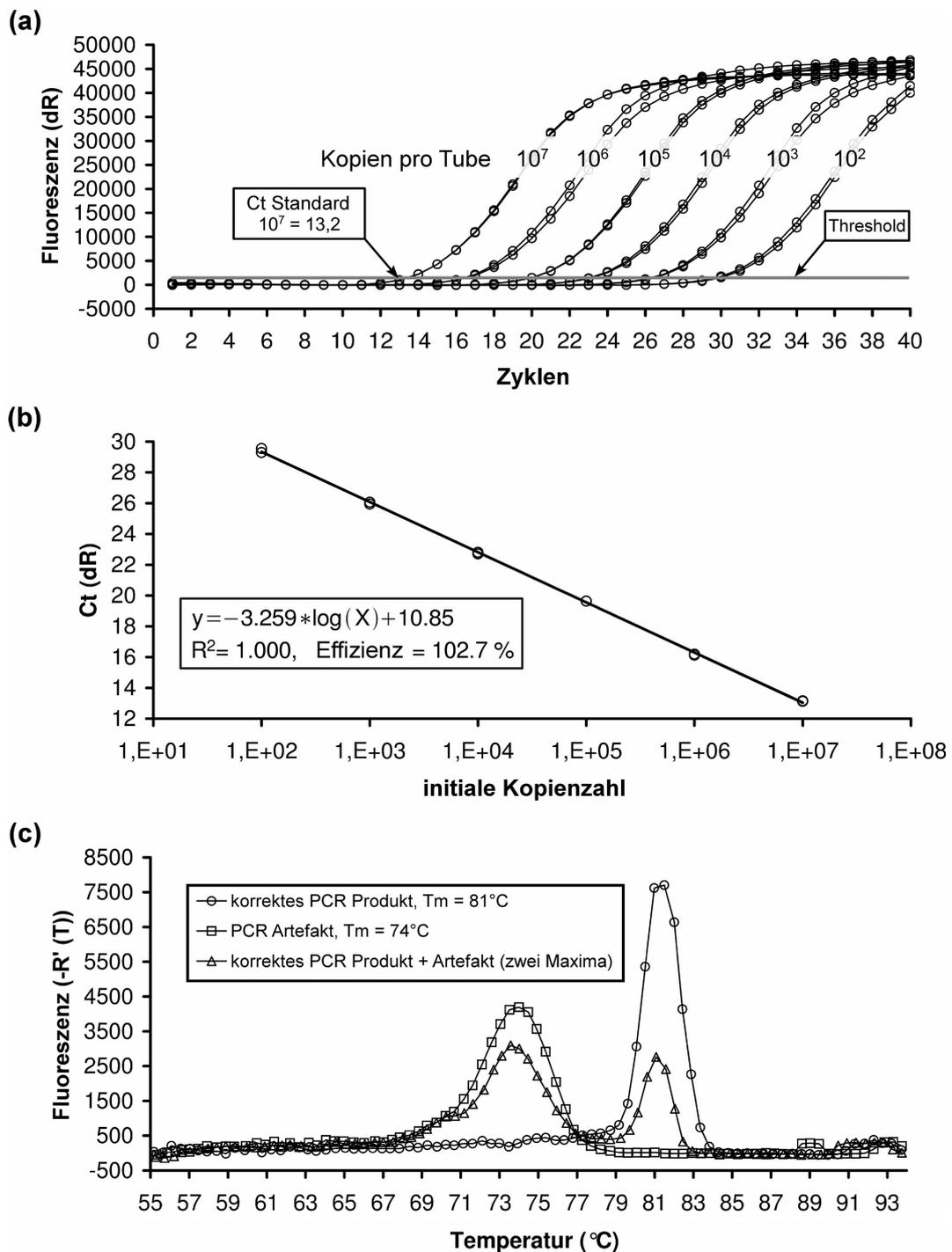


Abbildung 3.8: Überprüfung der Qualität der real-time qPCR. **(a)** Auftragung der Fluoreszenz-zunahmen in Abhängigkeit von der Zyklenzahl. Massenstandards mit hoher Kopienzahl zeigen einen niedrigen Ct (= Kreuzen der Fluoreszenzkurve mit dem Threshold). Technische Replikate zeigen eine sehr hohe Reproduzierbarkeit insbesondere im Bereich des Thresholds. **(b)** Eichkurve der unter (a) gezeigten Massenstandards. Das Bestimmtheitsmaß R^2 sowie die Effizienz wurden durch die Software des jeweiligen real-time PCR Geräts automatisch bestimmt. **(c)** Beispielhafte Darstellung einer Dissoziationskurven Analyse von drei unterschiedlichen Proben. PCR Artefakte wurden durch eine von dem gewünschten PCR Produkt abweichendem T_m identifiziert.

proportional zur Gesamt cDNA Konzentration der Proben waren. Zur Ermittlung der probenspezifischen Unterschiede in der Gesamt cDNA Konzentration wurde der Quotient zwischen den absoluten Expressionswerten einer festgelegten Kontrollprobe (z. B. Col-0, Wurzel, +Fe) und den weiteren Proben gebildet:

$$\frac{\text{Expressionslevel Kontrollprobe}}{\text{Expressionslevel Probe}} = \text{Normalisierungsfaktor}$$

Die für jede einzelne cDNA Probe gewonnenen zwei Normalisierungsfaktoren wurden auf Uniformität überprüft und gemittelt. Durch Multiplikation der Expressionslevel sämtlicher weiteren untersuchten Gene mit dem gemittelten Normalisierungsfaktor der jeweiligen cDNA Probe wurden in der Folge Konzentrationsunterschiede in der anfänglichen Gesamt-cDNA Menge ausgeglichen. Die so normalisierten und damit vergleichbaren Expressionsdaten stellten die Basis für die graphische Darstellung dar, die mit der Software SigmaPlot vorgenommen wurde.

3.6 Bestimmung der Fe Chelat Reduktase Aktivität

Die Aktivität der Fe Chelat Reduktase, als Maß für die Induktion der Fe Aufnahme, wurden über einen colorimetrischen Test basierend auf [Stephan und Procházka (1989)] bestimmt. 4 Wochen alte, unter Normalbedingungen im hydroponischen System angezogene Pflanzen wurden für 5 Tage auf +Fe (10 μM FeEDTA) und -Fe (0 μM FeEDTA) angezogen. Vor dem Umsetzen in Reaktionsröhrchen mit 4 mL Hoagland Medium mit 100 μM Fe und 300 μM Ferrozine wurden die Wurzeln 2 min unter stetigem Rühren in 100 mM $\text{Ca}_2(\text{NO})_3$ soweit wie möglich von apoplastischem Fe befreit. Die Pflanzen wurden 1h unter moderatem Schwenken und lichtgeschützt inkubiert, anschließend entstandenes Fe(II) durch die Bildung des farbigen Fe(II)-Ferozine Komplexes colorimetrisch bestimmt ($1A_{562} = 28,6 \text{ mM Fe(II)-Ferozine}$) und in Relation zum Frischgewicht der Wurzeln gesetzt.



4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der *NAS* Genfamilie

4.1.1 Die Phylogenie der *NAS* Genfamilie

Die *NAS* Genfamilie in *A. thaliana* umfasst vier Mitglieder, die auf den jeweils gegenüberliegenden Chromosomenarmen der Chromosomen I (*NAS3* und *NAS4*) und V (*NAS1* und *NAS2*) lokalisiert sind (vgl. Abbildung 4.1a). Die aus jeweils nur einem einzelnen Exon bestehenden Gensequenzen mit einer Länge von 963 bp (*NAS1*, *NAS2* & *NAS3*) sowie 975 bp (*NAS4*) sind hoch konserviert (vgl. Abbildung A.2 im Anhang). Die Phylogenetische Betrachtung durch multiples Alignment (CLUSTALW) zeigt eine jeweils sehr enge Verwandtschaft von bis zu 83% Identität zwischen auf dem gleichen Chromosom lokalisierten Genen, während interchromosomal maximal 69% Identität vorlag (vgl. Abbildung 4.1b). Die jeweils höhere intrachromosomale Ähnlichkeit der *NAS* Gene spiegelt sich auch im Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen wider (vgl. Abbildung 1.8b und Tabelle 4.1). Vergleichende Genkartierungen zwischen *S. esculentum* und *A. thaliana* ergaben, dass die vier *NAS* Gene aus *A. thaliana* sowie das einzelne *NAS* Gen aus *S. esculentum* von einem einzelnen ursprünglichen *NAS* Gen abstammen. Dabei bestand die größte Ähnlichkeit in der Abfolge von COS (conserved orthologous set) Markern zwischen *SeNAS* und *AtNAS3* [Bauer et al. (2004b)]. In Bezug auf die Evolution der

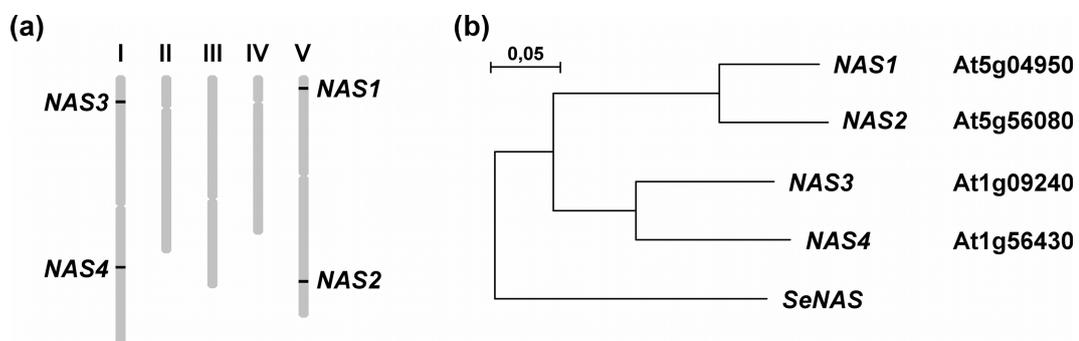


Abbildung 4.1: Darstellung der *NAS* Genfamilie in *A. thaliana*. (a) Schematische Darstellung der Lokalisierung der vier *NAS* Gene auf den Armen von Chromosom I und V. (b) Phylogramm der *NAS* Genfamilie basierend auf der CLUSTALW Analyse der *NAS* Aminosäuresequenzen. Die Astlängen des Phylogramms sind jeweils proportional zu der durchschnittlichen Anzahl an Abweichungen pro Aminosäuresequenz.

Tabelle 4.1: Phylogenetische Verwandtschaft der *NAS* Genfamilie. Basierend auf Sequenzvergleichen mittels CLUSTALW ist der jeweilige Grad der Konservierung zwischen Sequenzpaaren in % Identität dargestellt. Obere Tabellenhälfte: Ergebnis basierend auf der Aminosäuresequenz, untere Tabellenhälfte: Ergebnis basierend auf der Nukleotidsequenz. Zusätzlich zu der *NAS* Genfamilie aus *A. thaliana* wurde das einzige *NAS* Gen aus *S. esculentum* in die Analyse mit einbezogen.

	NAS1	NAS2	NAS3	NAS4	SeNAS	
NAS1		84	65	61	53	Aminosäure sequenz
NAS2	83		62	60	54	
NAS3	69	68		75	59	
NAS4	66	66	79		57	
SeNAS	60	55	56	55		
	Nukleotidsequenz					

NAS Genfamilie in *A. thaliana* deutete diese Beobachtung darauf hin, dass zunächst eine Genomduplikation, gefolgt von zwei weiteren, voneinander unabhängigen Genomduplikationen zu der vier *NAS* Gene umfassenden *NAS* Genfamilie geführt haben könnten.

4.1.2 Differentielle Expression der *NAS* Gene

Da die vier *NAS* Gene in *A. thaliana* sehr wahrscheinlich von einem einzelnen ursprünglichen *NAS* Gen abstammen, war zunächst die Frage zu klären, ob die Expression der *NAS* Gene auf redundante Genfunktionen hinweisen. Durch PCR mit genspezifischen Primern auf Volllänge cDNA aus unterschiedlichen Geweben wurde zunächst geklärt, in welchem Umfang eine Spezialisierung der *NAS* Gene auf bestimmte Gewebe vorliegt. Die *NAS* Gene waren überwiegend in den beiden untersuchten vegetativen Geweben, Wurzeln und Blätter, exprimiert. Während *NAS1* und *NAS4* Transkript in beiden Geweben nachgewiesen wurde, war *NAS2* und *NAS3* Transkript nur in jeweils einem der beiden Gewebe, *NAS2* in Wurzeln und *NAS3* in Blättern, nachweisbar. In den reproduktiven Organen von *A. thaliana* konnte hingegen nur Volllänge cDNA von *NAS1* und *NAS3* nachgewiesen, jeweils *NAS3* spezifisch in Blüten und *NAS1* spezifisch in Schoten (vgl. Abbildung 4.2).

Neben der somit festgestellten Gewebespezifität der *NAS* Gene wurde weiter geklärt, ob auch Unterschiede zwischen den *NAS* Genen in der Genregulation als Antwort auf Variationen in der Versorgung mit den zweiwertigen Metallionen Fe, Cu, Mn, Zn und Ni bestanden. Da in dem verwendeten Agarplattensystem mit Ausnahme von Fe die Induktion von Metallmangel sich als sehr schwierig erwies¹, wurden hauptsächlich Ernährungssituationen mit Metallüberschuss getestet. Die verwendeten Metallkonzentrationen wurden dazu zunächst in einem Vorversuch ermittelt, in dem Wild Typ Samen auf Hoagland Agar mit dem 3, 6, 9, 12 und 24fachen Gehalt des jeweiligen Metalls zur Keimung ausgelegt wurden und die Toxizität anhand des Phänotyps der Pflanzen

¹der Bedarf an Metallen lag mit Ausnahme von Fe im unteren μM Bereich. Durch Spuren von Metallen im verwendeten Pflanzenagar war ein absoluter Metallmangel im Agarplattensystem daher nicht induzierbar.

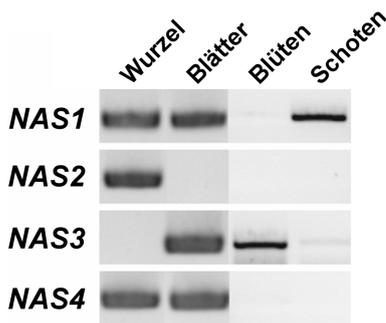


Abbildung 4.2: Gewebespezifischen Expression der *NAS* Gene. Entsprechend dem PCR Nachweis von Volllänge cDNA sind die Mitglieder der *NAS* Genfamilie, trotz der hoch konservierten Sequenzen und chromosomalen Organisation, in Bezug auf die Gewebespezifität differenziell exprimiert.

beurteilt wurde. Bedingungen, die nach drei Wochen einen deutlichen, aber nicht nekrotischen Phänotyp verursachten, wurden für die weitere Verwendung ausgewählt. Zwei Wochen alte, auf Standard Hoagland Medium angezogene Wild Typ Pflanzen wurden für fünf weitere Tage auf Hoagland Agar mit erhöhtem Metallgehalt (24x Fe, 6x Cu, 12x Mn, 24x Zn, 50 μ M Ni) und bei Fe Mangel (-Fe) angezogen. Die Bestimmung der Expressionslevel in Wurzel und Blattproben dieser Pflanzen erfolgte durch semi-quantitative RT PCR mit anschließender Southern Blot Hybridisierung (vgl. Abbildung 4.3). Die gewebe-spezifische Expression der *NAS* Gene in der Kontrollprobe entsprach im wesentlichen Abbildung 4.2, auch wenn nach diesem semi-quantitativen Experiment die *NAS1* Expression überwiegend in der Wurzel lokalisiert war. In Bezug auf die Änderungen in der Metallversorgung hatten Fe Mangel und Fe Überversorgung den deutlichsten Einfluss auf die Expressionslevel der *NAS* Gene. Während Fe Mangel zu einer Erhöhung der Expression von *NAS1*, *NAS2* und *NAS4* in den jeweiligen Geweben führte, zeigte *NAS3* eine geringfügige Verringerung der Expressionsintensität. Im Gegensatz dazu führte Fe Überschuss (24x Fe) zu einer deutlichen Induktion der *NAS3* Expression nicht nur in Blättern, sondern auch in Wurzeln. Die Expressionslevel der anderen *NAS* Gene blieben hingegen bei Fe Überschuss entweder unverändert (*NAS1* und *NAS2*) oder waren sogar reprimiert (*NAS4*). Diese gegenläufige Regulation von *NAS3* und *NAS4* in Antwort auf die Fe Versorgung ist auch insofern interessant, da nur diese beiden Gene in Blättern exprimiert sind.

Der Überschuss der in Hoagland Medium enthaltenen Metalle Cu, Mn und Zn verursachte nur geringe Änderungen in der Expression der *NAS* Gene, die in abgeschwächter Form der Genregulation bei Fe Mangel ähnelte. Deutlicher waren die Änderungen der Genexpression jedoch bei der Zugabe von 50 μ M Ni und stachen insbesondere dadurch hervor, dass im Gegensatz zu den anderen Stresssituationen eine Induktion sämtlicher *NAS* Gene inklusive *NAS3* zu beobachten war. Parallel zu den *NAS* Genen wurde auch die Expression der Markergene für Fe Mangel, *IRT1* und *FRO2*, unter den Metallstress Bedingungen analysiert. Interessanterweise war die Fe Mangelantwort bei Überschuss sämtlicher Metalle (außer Fe) induziert. Im Fall von Zn, das mit Fe in Konkurrenz um den Importer *IRT1* steht (vgl. Abschnitt 1.2.1.1), erreichte die Stärke der Induktion von *FRO2* sogar das gleiche Niveau wie unter Fe Mangel.

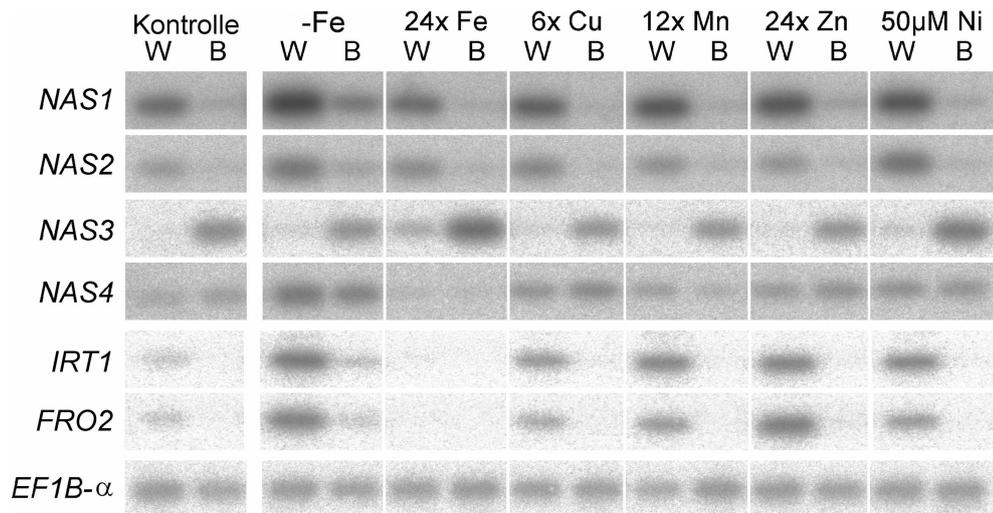


Abbildung 4.3: Differentielle Expression der *NAS* Genfamilie in Antwort auf Variationen in der Metallversorgung, untersucht mittels semi-quantitativer RT-PCR. 24x Fe = 240 µM; 6x Cu = 9 µM; 12x Mn = 240 µM; 24x Zn = 48 µM; Ni = 50 µM. Die Intensität der Banden wurde anhand der Expression des konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor *EF1B-alpha2* normalisiert. Neben der differentiellen Expression der *NAS* Gene wurde auch die Expression der für Fe Mangel spezifischen Markergene *IRT1* und *FRO2* analysiert. Dabei wurde eine Induktion der Fe Mangelantwort auch bei Überschuss von Cu, Mn, Ni und besonders Zn beobachtet. W = Wurzel, B = Blätter.

Zusammenfassend konnte also festgehalten werden, dass die vier *NAS* Gene in *A. thaliana* sowohl in Bezug auf die Gewebespezifität als auch in Bezug auf die Genregulation differentiell exprimiert waren.

4.2 Generierung der *nas* T-DNA Kollektion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung einer *nas* T-DNA Kollektion in *A. thaliana*, insbesondere einer Vierfachmutante (*nas4x*), in der sämtliche vier *NAS* Gene durch T-DNA Mutation ausgeschaltet oder in ihrer Funktion zumindest stark eingeschränkt sind. Die Erstellung der *nas* T-DNA Kollektion erforderte zunächst die Identifizierung und Verifizierung von geeigneten *nas* T-DNA Einzelmutanten, die die Grundlage für die durch Kreuzung zu erstellende *nas* T-DNA Kollektion bildeten.

Die Strategie der Generierung der *nas* T-DNA Kollektion, dargestellt in Abbildung 4.5 auf Seite 75, beruhte auf der Überlegung, dass mehrfache homozygote Mutationen auf dem selben Chromosom nach dem Kreuzen von Einfachmutanten nicht durch Segregation, sondern nur durch homologe Rekombinationen zu erreichen sind. Da mit zunehmender Zahl an *nas* Mutationen eine reduzierte Vitalität der Mutanten erwartet wurde, erschien es angebracht, zunächst die homologe Rekombination benötigenden *nas* Doppelmutanten, *nas1-1nas2-1* und *nas3-1nas4-1* zu generieren. Die komplexe, und daher in der Vitalität am wahrscheinlichsten reduzierte *nas4x* Mutante sollte dann durch das Kreuzen der homozygoten *nas1-1nas2-1* und *nas3-1nas4-1* Doppelmutanten generiert werden und

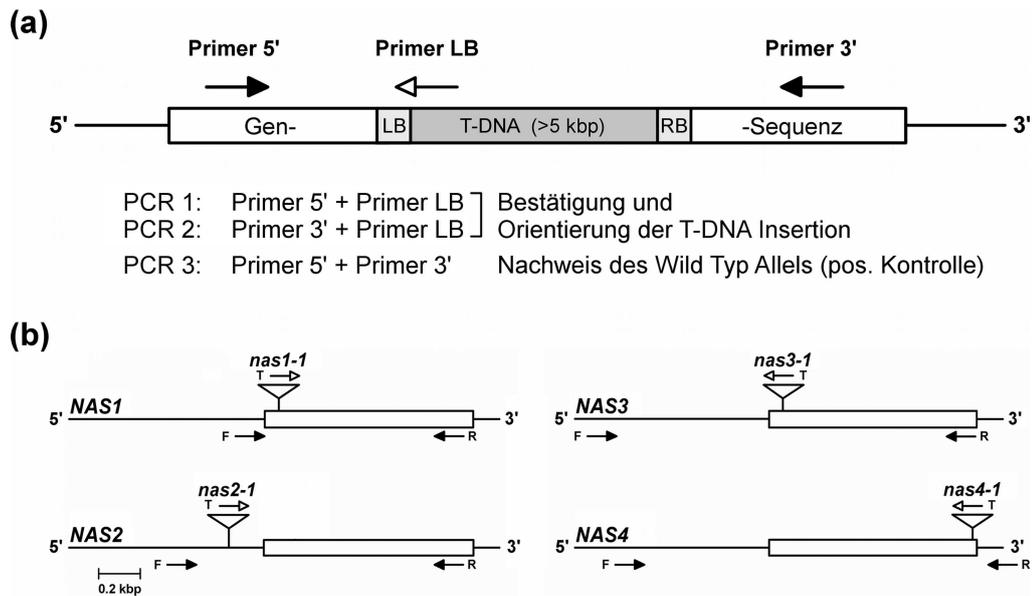


Abbildung 4.4: Identifizierung und Verifizierung annotierter *nas* T-DNA Insertionsmutanten. (a) Darstellung der Identifizierung und Genotypisierung von *nas* T-DNA Insertionsmutanten mittels PCR. Homozygote *nas* T-DNA Insertionsmutanten wurden durch positive PCR1 bzw. PCR2 sowie negativer PCR3 identifiziert. LB = left border, RB = right border. (b) Schematische Darstellung der in dieser Arbeit analysierten und zu Kreuzungen verwendeten *nas* T-DNA Insertionsmutanten. Geschlossene Pfeile kennzeichnen die Positionen der auf der genomischen DNA hybridisierenden genotypisierungs Primer (F = forward, R = reverse). Die stets am LB der T-DNA befindlichen T-DNA Primer (T, offene Pfeile) kennzeichnen die Orientierung der T-DNA im Genom.

somit keine weitere homologe Rekombination benötigen. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen, zur Generierung der *nas* T-DNA Kollektion durchgeführten Schritte im Detail erläutert.

4.2.1 Identifizierung und Verifizierung der *nas* T-DNA Insertionslinien

Zunächst wurden die öffentlich zugänglichen Datenbanken nach annotierten *nas* T-DNA Insertionslinien durchsucht und Samen von potentiellen Kandidaten bestellt. Da die jeweiligen Datenbanken zu Beginn der Arbeit im Aufbau begriffen und demzufolge bei weitem noch nicht alle T-DNA Insertionslinien annotiert waren, wurde die Datenbankrecherche in regelmäßigem Abstand wiederholt und neu annotierte potentielle Kandidaten nachbestellt. Insgesamt wurden auf diese Art und Weise 20 unterschiedliche *nas* T-DNA Insertionslinien zeitlich versetzt identifiziert, bestellt und analysiert.

Potentielle *nas* T-DNA Insertionslinien wurden zunächst auf Hoagland Medium enthaltenden Agarplatten angezogen. Aus Blättern von ca. zwei Wochen alten Pflanzen wurde genomische DNA isoliert, auf der mittels geeigneter PCR das Vorkommen einer T-DNA innerhalb des annotierten *NAS* Gens nachgewiesen wurde. Dieser Nachweis umfasste jeweils drei unabhängige PCR Reaktion (vgl. Abbildung 4.4a). Bei Pflanzenproben, in denen durch PCR1 bzw. PCR2 das Vorhandensein sowie die Orientierung der T-DNA Insertion bestätigt wurde, wurde das entsprechende PCR Fragment aufgereinigt und

dessen Sequenzierung in Auftrag gegeben. Durch Vergleich des Sequenzierergebnisses mit der Gensequenz des entsprechenden *NAS* Gens wurde die exakte Position der T-DNA Insertion in dem jeweiligen *NAS* Gen bestimmt.

Unter den positiven *nas* T-DNA Insertionslinien (vollständige Liste siehe Tabelle A.1 im Anhang) wurden geeignete Linien für die weitere Bearbeitung selektiert (vgl. Tabelle 4.2 sowie Abbildung 4.4b). Im Fall von *nas1-1* und *nas3-1* lagen die T-DNA Insertionen jeweils 69 bp hinter dem Start Codon. Dadurch war in diesen Linien die Bildung von trunkiertem aber *NAS* Aktivität ausübendem *NAS1* bzw. *NAS3* Protein aufgrund partieller Transkription sehr unwahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu befand sich die T-DNA Insertion in der *nas4-1* Mutante gerade einmal 19 bp vor dem STOP Codon. Zwar war in dieser T-DNA Insertionslinie die Produktion eines fast vollständigen *NAS4* Transkripts denkbar. Dieses wäre jedoch aufgrund des nächst gelegenen STOP Codons um 112 bp Nukleotidsequenz der T-DNA verlängert, was im Fall einer Translation eine Verlängerung des *NAS4* N-Terminus um 36 Aminosäuren zur Folge hätte. Abgesehen von der offenen Frage, ob derart veränderte mRNA überhaupt stabil ist und translatiert wird, war durch die Verlängerung der Aminosäuresequenz zumindest eine Konformationsänderung des *NAS4* Proteins und damit eine Reduktion oder der Verlust der *NAS4* Enzymaktivität in dieser T-DNA Insertionslinie denkbar. Mangels alternativer *nas4* T-DNA Insertionslinien wurde daher diese nicht optimale *nas4-1* T-DNA Insertionslinie für die weiteren Analysen und Kreuzungen verwendet.

Weitaus schwieriger gestaltete sich die Entscheidung, *nas2-1* als T-DNA Insertionslinie zu verwenden. In der zum Zeitpunkt der Selektion einzigen verfügbaren *nas2* T-DNA Insertionslinie war die T-DNA 70 bp vor dem Start Codon im 5'-UTR von *NAS2* inseriert. Dadurch war die Produktion von Volllänge *NAS2* Transkript theoretisch möglich. Ein Ausschalten der *NAS2* Genfunktion war demnach einzig durch die Separation des Gens vom Promotor und der damit verbundenen Möglichkeit der regulatorischen Entkopplung der *NAS2* Transkription denkbar. Die in Tabelle A.1 im Anhang aufgeführte T-DNA Insertionslinie *nas2-2* mit einer Insertion im Exon von *NAS2* 144 bp hinter dem Start Codon wurde erst nach der erfolgreichen Generierung der *nas1-1nas2-1* Doppelmutante isoliert und daher in dieser Arbeit zunächst nicht weiter berücksichtigt.

Da die T-DNA Mutagenese auf der zufälligen Integration der T-DNA in das Pflanzen-genom beruhte, war es wichtig, mögliche, auf zusätzliche T-DNA Integrationen zurück

Tabelle 4.2: Auflistung der zur Erstellung der *nas* T-DNA Kollektion verwendeten *nas* T-DNA Insertionslinien.

Kürzel	Bezeichnung	Ursprung	Position	Antibiotika Resistenz
<i>nas1-1</i>	GABI-Kat 223A09	GABI-Kat	Exon, 69 bp nach ATG	Sulfadiazin
<i>nas2-1</i>	SAIL 156C08	Syngenta	5'-UTR, 70 bp vor ATG	BASTA
<i>nas3-1</i>	GABI-Kat 010A10	GABI-Kat	Exon, 69 bp nach ATG	Sulfadiazin
<i>nas4-1</i>	SALK 135507	SALK	Exon, 19 bp vor STOP	Kanamycin

zu führende Sekundäreffekte auszuschließen. Die durch das in der T-DNA enthaltene Resistenzgen vermittelte Antibiotikaresistenz (vgl. Tabelle 4.2 / S. 73) stellte ein nach der mendelschen Spaltungsregel dominant vererbtes Merkmal dar, das zur Identifikation möglicher Mehrfachinsertionen genutzt werden konnte. Im Fall einer einzigen T-DNA Insertion pro heterozygoter Linie war demnach zu erwarten, dass ca. 75 % der auf Selektionsmedium gekeimten Samen gegenüber dem Antibiotikum resistent waren. Da weitere T-DNA Insertionen durch die zufällige Integration in das Genom mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mit der ersten T-DNA Insertion kosegregierten, wurde für einen solchen Fall ein erhöhter Prozentsatz resistenter Keimlinge angenommen. Die Segregationsanalyse der auf Antibiotika haltigem Pflanzenmedium (Gamborg B5 Agar) selektierten heterozygoten Einfachmutanten zeigte ausnahmslos eine Antibiotikaresistenz von ca. 75 %: *nas1-1*, 75,7 % (n = 33); *nas2-1*, 73,3 %; (n = 15), *nas3-1*, 77,4 % (n = 115)² und *nas4-1*, 71,9 % (n = 16). Die selektierten T-DNA Insertionslinien wurden daher als Mutanten mit jeweils nur einer einzigen integrierten T-DNA identifiziert.

4.2.2 Generierung der *nas1-1nas2-1* und *nas3-1nas4-1* Doppelmutanten

Jeweils zwei *NAS* Gene (*NAS1* und *NAS2* sowie *NAS3* und *NAS4*) waren auf dem selben Chromosom lokalisiert. Da homozygote Doppelmutanten zwischen auf dem selben Chromosom lokalisierten Genen nur durch homologe Rekombination in der Meiose generiert werden konnten, wurden zunächst die Doppelmutanten *nas1-1nas2-1* sowie *nas3-1nas4-1* generiert (vgl. Abbildung 4.5). Pflanzen der F1 Generationen der Kreuzungen *nas1-1* × *nas2-1* und *nas3-1* × *nas4-1*, jeweils heterozygot für *nas1-1nas2-1* oder *nas3-1nas4-1*, wurden durch Selbstung (⊗) vermehrt. In der daraus resultierenden F2 Generation wurden in der Folge Pflanzen mittels PCR auf das Vorhandensein homozygoter T-DNA Insertionen in *NAS* Genen eines Chromosoms getestet (PCR Schema vgl. Abbildung 3.4a). Die einfache Rekombination zwischen den jeweiligen homologen Chromosomen fand mit einer Frequenz von 5-10 % statt und lag in der Lokalisation der *NAS* Gene jeweils distal auf gegenüber liegenden Chromosomenarmen begründet. Aus F2 Pflanzen, in denen nur ein Rekombinationsereignis stattgefunden hatte (z.B. *nas1-1* homozygot, *nas2-1* heterozygot), wurden nach erneuter Selbstung homozygote Doppelmutanten (*nas1-1nas2-1* und *nas3-1nas4-1*) in der F3 Generation durch PCR selektiert.

4.2.3 Generierung der Dreifach- und Vierfachmutanten

Durch Kreuzung von homozygoten *nas1-1nas2-1* und *nas3-1nas4-1* wurden zunächst heterozygote *nas1-1nas2-1nas3-1nas4-1* F1 Pflanzen generiert und geselbstet. Da die

²da GABI-Kat unmittelbar vor Auslieferung der Samen das Segregationsverhältnis jeweils selbst überprüft, wurde bei dieser Linie die Segregation nicht selbst getestet, sondern die Angaben von GABI-Kat übernommen.

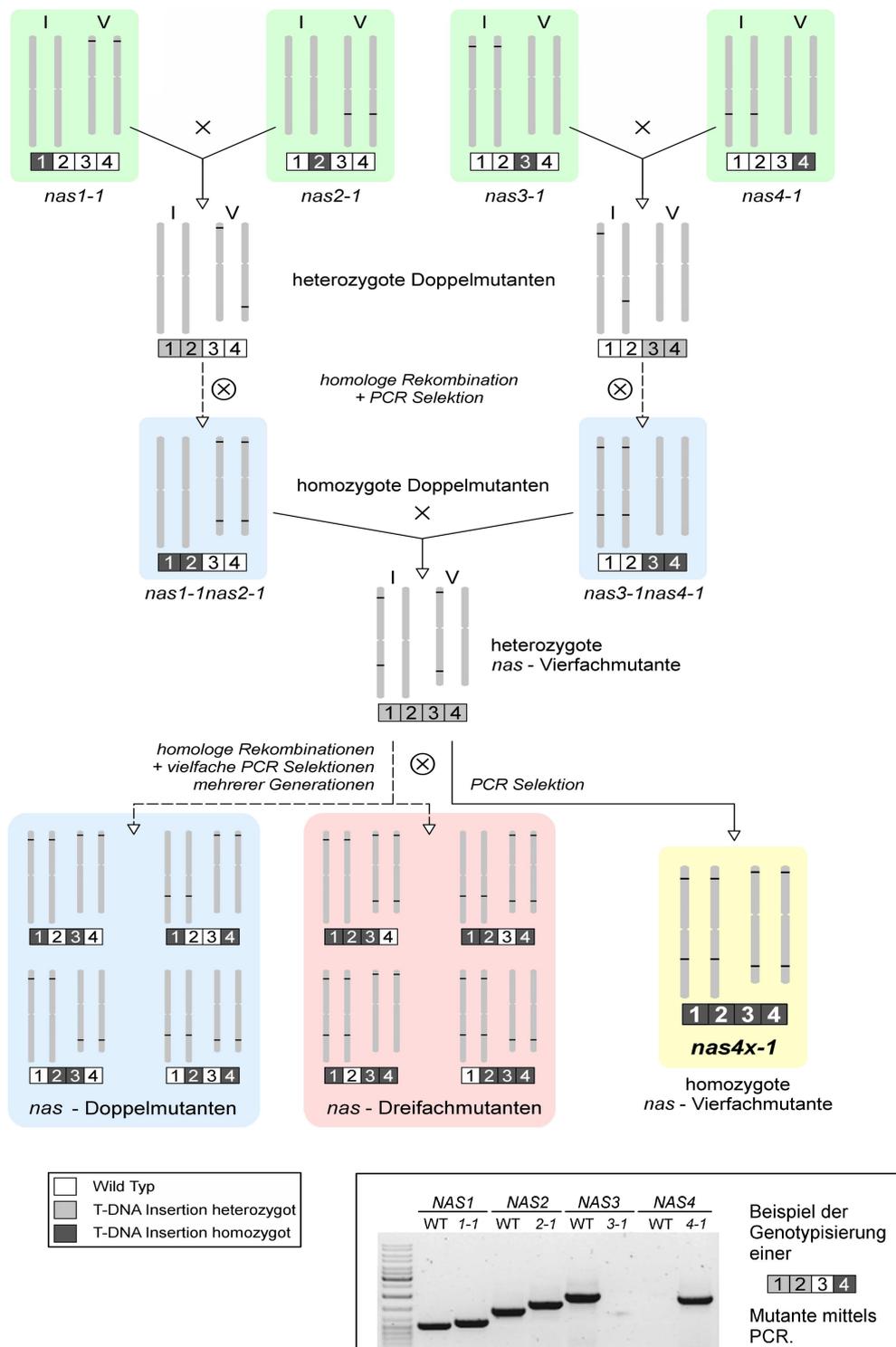


Abbildung 4.5: Kreuzungsschema zur Veranschaulichung der Generierung der *nas* T-DNA Kollektion. Dargestellt sind jeweils die Chromosomenpaare I und V sowie die darauf lokalisierten *nas* T-DNA Insertionen. Unterhalb der Chromosomenschemata ist der jeweilige *nas* Genotyp entsprechend der in der Abbildung dargestellten Farbkodierung dargestellt. × = Kreuzung; ⊗ = Selbstung. Erläuterung siehe Text.

homologe Rekombination zwischen den *NAS1* und *NAS2* sowie den *NAS3* und *NAS4* Loci mit ca. 5-10 % zu erwarten war (vgl. Abschnitt 4.2.2), bot sich dieser Umstand zur Generierung der gesamten *nas* T-DNA Kollektion an. Durch den mit relativ hoher Frequenz statt findenden individuellen Verlust entweder des *nas* T-DNA oder des *NAS* Wild Typ Allels war in der F2 Generation theoretisch jede Kombination von *nas* T-DNA Mutationen möglich. Daher wurden ca. 100 Individuen der F2 Generation durch jeweils acht unterschiedliche PCR Reaktionen auf das Vorhandensein jedes einzelnen *nas* T-DNA und *NAS* Wild Typ Allels genotypisiert und Pflanzen mit Rekombinationsereignissen selektiert. Viele *nas* T-DNA Kombinationen benötigten allerdings mehrere Rekombinationsereignisse. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit, in der F2 Generation tatsächlich sämtliche *nas* T-DNA Kombinationen zu isolieren, wurden in der F2 Generation auch solche Pflanzen isoliert, die bereits einfache oder doppelte Rekombinationen der *NAS* Allele durchlaufen hatten, aber noch nicht homozygot waren. Durch Selbstung und weitere Selektion dieser Pflanzen konnten so in den folgenden Generationen sämtliche *nas* T-DNA Kombinationen, insbesondere die *nas* Vierfachmutante (*nas4x-1*), homozygot isoliert werden.

4.3 Verifizierung und analytische Charakterisierung der *nas* T-DNA Mutationen

4.3.1 Überprüfung von *NAS* Volllänge cDNA

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der *nas* Gensequenzen erwies es sich als sinnvoll, den Effekt der *nas* Mutationen auf Transkriptebene nicht in den Einfachmutanten, sondern erst in der *nas4x-1* Mutante zu überprüfen. Analog zu dem in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Nachweis der gewebespezifischen *NAS* Expression wurde RNA aus Wurzeln, Blättern, Blüten und Schoten der *nas4x-1* Mutante gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mit genspezifischen, den kompletten Leserahmen amplifizierenden PCR Primern wurde dann nach der Präsenz von Volllänge cDNA mittels PCR gesucht (vgl. Abbildung 4.6).

In der *nas4x-1* Mutante konnte in der Tat keine Volllänge cDNA von *NAS1*, *NAS3* und *NAS4* nachgewiesen werden. Insbesondere *nas1-1* und *nas3-1*, deren T-DNA im 5'-Bereich des Exons lagen, galten mit diesem Resultat als ausgeschaltete *NAS* Allele. Im Gegensatz dazu konnte der Effekt des *nas4-1* Allels mit diesem Resultat nur insoweit beurteilt werden, dass keine Volllänge cDNA produziert wurde. Inwieweit ein um 112bp der T-DNA verlängertes *NAS4* Transkript (vgl. Abschnitt 4.2.1) stabil produziert und ggf. in enzymatisch aktives *NAS4* Protein translatiert werden würde, konnte hingegen nicht beurteilt werden.

Im Gegensatz zu *NAS1*, *NAS3* und *NAS4* konnte in der *nas4x-1* Mutante *NAS2* Volllänge cDNA nicht nur in Wurzel, sondern auch in Blättern, Blüten und Schoten nachgewiesen werden. Da Wild Typ jedoch nur in Wurzeln *NAS2* Transkription zeigte, wurde davon

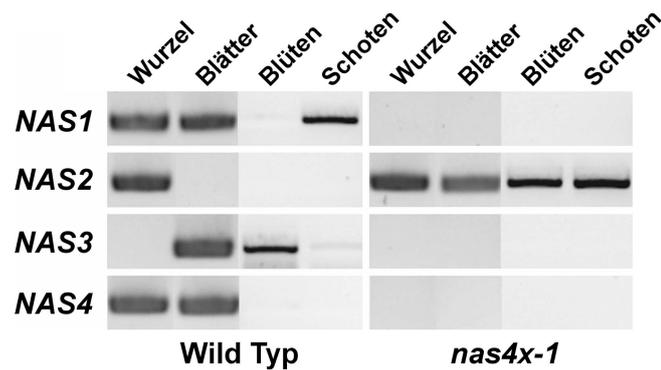


Abbildung 4.6: Nachweis von *NAS* Volllänge cDNA in der *nas4x-1* Mutante im Vergleich zu Wild Typ. Während *NAS1*, *NAS3* und *NAS4* cDNA in der *nas4x-1* Mutante nicht nachgewiesen werden konnte, war *NAS2* Volllänge cDNA nicht nur in Wurzeln, sondern im Gegensatz zu Wild Typ auch in Blättern, Blüten und Schoten präsent.

ausgegangen, dass das *nas2-1* Allel durch die T-DNA Insertion im 5'-UTR einen Verlust der Gewebespezifität von *NAS2* verursacht hatte. Aufgrund der rein qualitativen Natur dieser Aussage konnten allerdings keinerlei Rückschlüsse auf quantitative Effekte des *nas2-1* Allels in der Physiologie der *nas4x-1* Mutante gezogen werden.

4.3.2 Bestimmung der NA Gehalte

Um eine quantitative Aussage über die Wirkung der *nas* T-DNA Insertionen zu treffen, wurden die Gehalte des Metaboliten Nicotianamin in Pflanzenextrakten bestimmt. Die zu diesem Zweck neu etablierte Analysemethode ist in Abschnitt 3.4.2 auf Seite 58 im Detail beschrieben.

Mit dem Agarplattensystem war unter Kontrollbedingungen an der *nas4x-1* Mutante kein *nas* Phänotyp zu beobachten. Deshalb wurde in Anlehnung an die hydroponische Anzucht von Tomaten ein hydroponisches Anzuchtssystem für *A. thaliana* etabliert (vgl. Abbildung 3.2f-h / S. 50). In diesem Anzuchtssystem zeigte die *nas4x-1* Mutante unter Kontrollbedingungen eine interkostale Chlorose v. a. junger Blätter, die insbesondere beim Übergang von vegetativen zum reproduktiven Wachstum deutlich zunahm. Um diesen Unterschied näher zu charakterisieren, wurden die NA Gehalte in Blättern des vegetativen und des reproduktiven Wachstumsstadiums bestimmt. Eine genauere Beschreibung des *nas* Phänotyps und der *nas* T-DNA Kollektion erfolgt in Abschnitt 4.4.

4.3.2.1 Im vegetativen Entwicklungsstadium enthielten Blätter der *nas4x-1* Mutante ca. 10% NA im Vergleich zu Wild Typ

Zur Bestimmung der NA Gehalte von Blättern im vegetativem Entwicklungsstadium wurde das Anzuchtssystem auf Kurztagbedingungen (9h Licht, 15h Dunkelheit) eingestellt und damit das Einsetzen des reproduktiven Wachstums unterbunden. NA-Extrakte wurden aus den Rosetten 7 Wochen alter, nicht-chlorotischer Pflanzen gewonnen (vgl. Ab-

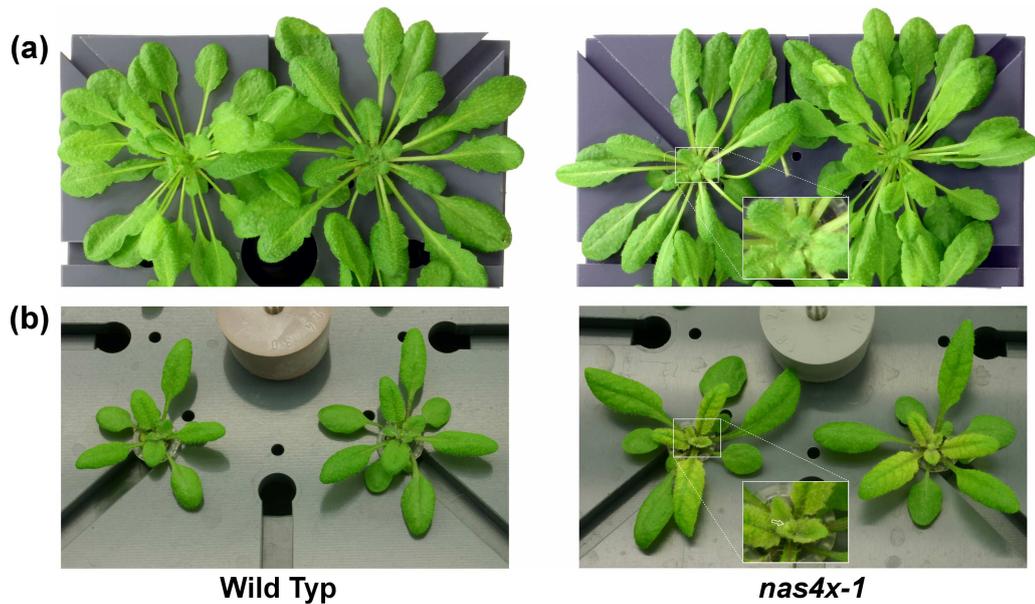


Abbildung 4.7: Blattphänotypen von Wild Typ und *nas4x-1* zum Zeitpunkt der Materialernte für NA Messungen. **(a)** Vegetatives Entwicklungsstadium unter Langtagbedingungen. *nas4x-1* Mutanten waren nicht chlorotisch und unterschieden sich nicht von Wild Typ. Pflanzenalter: ca. 7 Wochen. **(b)** Beginnendes reproduktives Entwicklungsstadiums unter Kurztagbedingungen (Pfeil in Vergrößerung: Blütenknospen). *nas4x-1* Mutanten entwickelten unter diesen Bedingungen eine deutliche Chlorose v.a. junger Blätter. Pflanzenalter ca. 5 Wochen.

bildung 4.7a). Im Vergleich zu Wild Typ enthielt die *nas4x-1* Mutante ca. 10% NA (vgl. Abbildung 4.8a). Zur Klärung, inwiefern sich das *nas2-1* Allel auf den NA Gehalt auswirkte, wurde zum Vergleich parallel die Dreifachmutante *nas1-1nas3-1nas4-1* analysiert. In Blattextrakten dieser Mutante, die sich von der *nas4x-1* Mutante nur durch das intakte Wild Typ *NAS2* Allel unterschied, wurde mit 38% ein deutlich höherer NA Gehalt als in der *nas4x-1* Mutante bestimmt. Das *nas2-1* Allel führte demnach trotz der mit dem Verlust der Gewebespezifität einher gehenden *NAS2* Transkription in Blättern, zu einer deutlichen Verringerung des NA Gehalts. Daher wurde die *nas2-1* Mutation insgesamt als „knock-down“ mit einer die *NAS2* Aktivität reduzierenden Wirkung bewertet.

4.3.2.2 Im reproduktivem Entwicklungsstadium der *nas4x-1* Mutante akkumulierte NA in den reproduktiven Organen

Um durch Blattseneszenz hervorgerufene Sekundäreffekte auf den NA Gehalt zu vermeiden, wurden möglichst junge Pflanzen mit beginnendem reproduktivem Wachstum für die NA Analyse verwendet. Blätter von ca. 5 Wochen alten, unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogenen *nas4x-1* Mutanten zeigten in dieser Phase eine deutliche interkostale Chlorose. Das einsetzende reproduktive Wachstum war durch die Ausbildung erster Blütenknospen ersichtlich (vgl. Abbildung 4.7b, Vergrößerung).

Blattextrakte dieser im beginnenden reproduktiven Entwicklungsstadium befindlichen Pflanzen enthielten im Gegensatz zum vegetativen Entwicklungsstadium keine detektierbaren

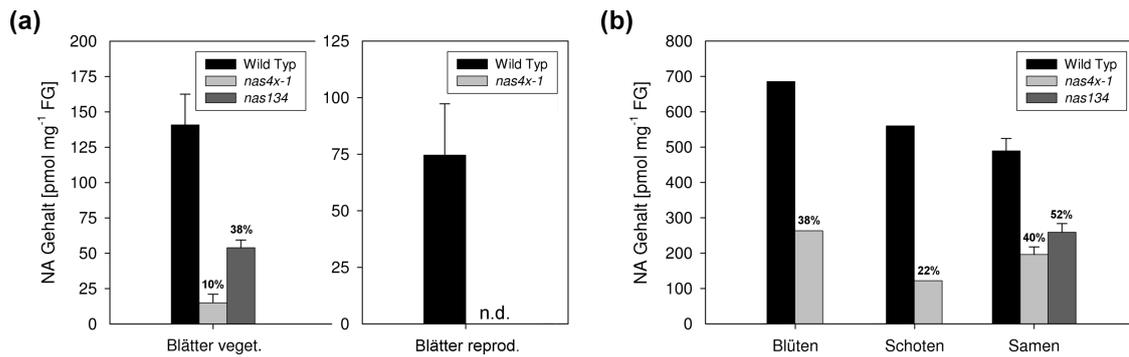


Abbildung 4.8: Bestimmung der NA Gehalte in Blättern, Blüten, Schoten und Samen von Wild Typ und *nas4x-1* Mutante. **(a)** Vergleich der NA Gehalte in Blättern der reproduktiven und vegetativen Entwicklungsphase entsprechend Abbildung 4.7. Während in der reproduktiven Phase kein NA in Blättern der *nas4x-1* Mutante detektiert wurde ($n=3$), enthielten Blätter der vegetativen Phase 10% NA im Vergleich zu Wild Typ ($n=8$). **(b)** Analyse der NA Gehalte in reproduktiven Organen sowie Samen. Die detektierbaren NA Gehalte in der *nas4x-1* Mutante waren im Verhältnis zu Wild Typ stets deutlich höher als in vegetativen Blättern ($n_{\text{Blüten u. Schoten}} = 1$, $n_{\text{Samen}} = 4$). **(a+b)** Vegetative Blätter sowie Samen der Dreifachmutante *nas1-1nas3-1nas4-1* (= *nas134*) mit intaktem *NAS2* Gen enthielten jeweils größere Mengen NA als die *nas4x-1* Mutante.

Mengen an NA (vgl. Abbildung 4.8a + Chromatogramm in Abbildung A.1 im Anhang). Um den Verbleib des NA im reproduktiven Entwicklungsstadium aufzuklären, wurden in der Folge NA Extrakte aus den reproduktiven Organen adulter Pflanzen (Blüten und Schoten) sowie aus Samen gewonnen. In der Tat konnte NA in Extrakten aus diesen Geweben der *nas4x-1* Mutante nachgewiesen werden. Zudem waren die NA-Gehalte im Vergleich zu Wild Typ in Blüten mit 38%, in Schoten mit 22% und in Samen mit 40% NA (vgl. Abbildung 4.8b) im Verhältnis jeweils größer als in Blättern des vegetativen Entwicklungsstadiums (ca. 10%). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass aufgrund geringer Materialausbeuten keine Replikate der Proben aus Blüten und Schoten gemessen werden konnten. Dennoch kann man festhalten, dass in der reproduktiven Wachstumsphase kein NA in Blättern, wohl aber in Blüten, Schoten und Samen der *nas4x-1* Mutante nachgewiesen wurde. Dies bestärkt die Hypothese, dass NA bei einsetzendem reproduktiven Wachstum wahrscheinlich aus den Blättern in die reproduktiven Organe verlagert wird.

4.3.3 Bestimmung der Metallgehalte

NA wird eine wichtige Rolle in der Metallhomöostase von Pflanzen zugesprochen. Zur Bewertung des mit den *nas* Mutationen einhergehenden NA Mangels wurde daher der Effekt der *nas* Mutationen auf die Metallhomöostase durch Messung der Gehalte an Fe, Zn und Cu bestimmt. Die untersuchten Proben der einzelnen Entwicklungsstadien stammten dabei vorwiegend von den gleichen Pflanzen, in denen auch die zuvor beschriebenen NA Gehalte bestimmt wurden.

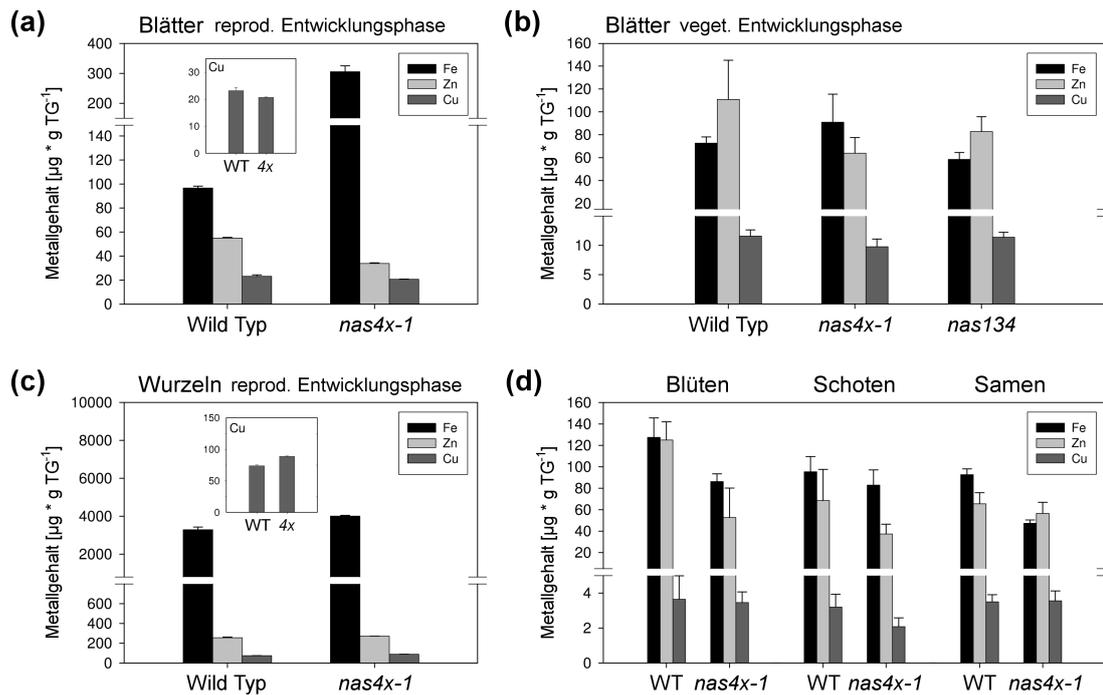


Abbildung 4.9: Bestimmung der Metallgehalte in Wild Typ und *nas4x-1* Mutante. **(a+b)** Vergleichende Analyse von Blattproben des reproduktiven und vegetativen Entwicklungsstadiums entsprechend Abbildung 4.7b. $n_{\text{reprod.}} = 3$ $n_{\text{veget.}} = 8$. **(c)** Metallgehalte Wurzeln des reproduktiven Entwicklungsstadiums, Pflanzen identisch zu (a). **(d)** Metallgehalte in reproduktiven Organen sowie Samen ($n=5-6$). TG=Trockengewicht.

4.3.3.1 Die Fe, Zn und Cu Homöostase war in der *nas4x-1* Mutante gestört

Die Metallhomöostase der *nas4x-1* Mutante war sowohl in Blättern des vegetativen als auch des reproduktiven Entwicklungsstadiums gestört. Entsprechend den Beobachtungen des NA Gehalts und des *nas* Phänotyps wurde auch in Bezug auf die Metallhomöostase im beginnenden reproduktiven Entwicklungsstadium die größten Unterschiede zwischen *nas4x-1* Mutante und Wild Typ beobachtet (vgl. Abbildung 4.9a+b).

Tendenziell akkumulierte Fe in Blättern der *nas4x-1* Mutante (reprod.: +216%, veget.: +25%) während die Gehalte an Zn (reprod.: -38%, veget.: -42%) und Cu (reprod.: -11%, veget.: -16%) reduziert waren. Die in Blättern des vegetativen Entwicklungsstadiums enthaltenen, im Vergleich zu Wild Typ 10% Rest-NA wirkten sich demnach hauptsächlich auf den Fe Gehalt der Blätter aus, während die Gehalte an Zn und Cu kaum verändert waren. Die Analyse der *nas1-1nas3-1nas4-1* (*nas134*) Dreifachmutante, deren Blätter im vegetativen Entwicklungsstadium mit 38% annähernd das Vierfache des NA Gehalts der *nas4x-1* Mutante enthielten, ergab erwartungsgemäß eine deutliche Annäherung der Zn und Cu Gehalte an das Wild Typ Niveau (Zn: -25%, Cu: -1%). Im Bezug auf die Fe Gehalte konnte dagegen sogar ein deutlich reduzierter Gehalt im Vergleich zu Wild Typ beobachtet werden (-20%).

In Wurzeln des reproduktiven Entwicklungsstadiums akkumulierte die *nas4x-1* Mutante zwar ebenfalls Fe, mit +22% im Vergleich zu Blättern aber eher moderat (vgl. Abbildung

4.9c). Zn, das in Blättern mit -38% stark reduziert war, war in Wurzeln der gleichen Pflanzen nahezu in gleicher Menge enthalten wie in Wild Typ. Bei Cu, das in Blättern nur leicht reduziert war, war hingegen sogar eine leichte Akkumulation in Wurzeln der *nas4x-1* Mutante mit $+20\%$ zu beobachten. Während Fe in der *nas4x-1* Mutante also im Übermaß aus den Wurzeln in den Sproß transportiert und dort angereichert werden konnte, bestand für Zn und insbesondere Cu eine eingeschränkte Translokation bereits aus den Wurzeln in den Sproß.

Die Akkumulation von NA in den reproduktiven Organen der *nas4x-1* Mutante (vgl. Abschnitt 4.3.2.2) deutete auf eine essentielle Funktion des NA in der Metallversorgung der reproduktiven Organe hin. Die Analyse von Blüten, Schoten sowie Samen der *nas4x-1* Mutante ergab in der Tat eine gestörte Metallhomöostase, die v. a. in einer Reduktion der Fe und Zn Gehalte im Vergleich zu Wild Typ, aber auch in einer Reduktion des Cu Gehalts exklusiv in Schoten bestand (vgl. Abbildung 4.9d). Interessanterweise war in Blüten und Schoten der Gehalt an Zn mit einer Reduktion um 58% (Blüten) und 46% (Schoten) deutlich stärker reduziert als Fe (Blüten: -32% , Schoten: -13%). Umgedreht war der Fe Gehalt in Samen (-49%) aber deutlich stärker reduziert als der Zn Gehalt (-13%). Dieses Ergebnis bestätigte im Kern die Vermutung, dass NA eine wichtige Rolle in der Metallversorgung der reproduktiven Organe spielt.

4.4 Physiologische Charakterisierung der *nas* T-DNA Kollektion

4.4.1 Beschreibung des *nas* Phänotyps

Zu Beginn der Arbeit war unbekannt, inwiefern sich der Verlust oder eine drastische Absenkung der NAS Aktivität auf dem Phänotyp von *A. thaliana* auswirken würde. Da NA mobil in der Pflanze transportiert wird (vgl. Abschnitt 1.3), war eine Kompensation einer oder mehrerer *nas* Mutationen durch verbliebene *NAS* Gene zu erwarten. In der Tat waren auf Erde angezogene Einfachmutanten von Wild Typ Pflanzen nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt). Kombinationen mehrerer *nas* T-DNA Mutationen entwickelten hingegen mehr oder weniger stark ausgeprägte Chlorosen, die tendenziell mit der Zahl der *nas* Mutationen in ihrer Ausprägung zunahmten und in der *nas4x-1* Mutante am stärksten war. Die *nas* Chlorose zeichnete sich insbesondere durch eine deutliche Aufhellung der Ränder von jungen Blättern aus. In älteren Pflanzen war auch die Zahl der jungen Blätter insgesamt erhöht. Ältere Blätter bildeten zudem vereinzelt eine an *chloronerva* erinnernde, interkostale Chlorose aus (vgl. Abbildung 4.10).

Die Ausprägung der Chlorosen hing wie zuvor beschrieben stark vom jeweiligen Entwicklungsstadium ab. Im vegetativen Entwicklungsstadium unterschieden sich *nas4x-1* Mutante und Wild Typ nur unwesentlich durch eine leichte Chlorose an der Basis der ersten Blätter der *nas4x-1* Mutante (vgl. Abbildung 4.10a). Bei näherer Betrachtung der

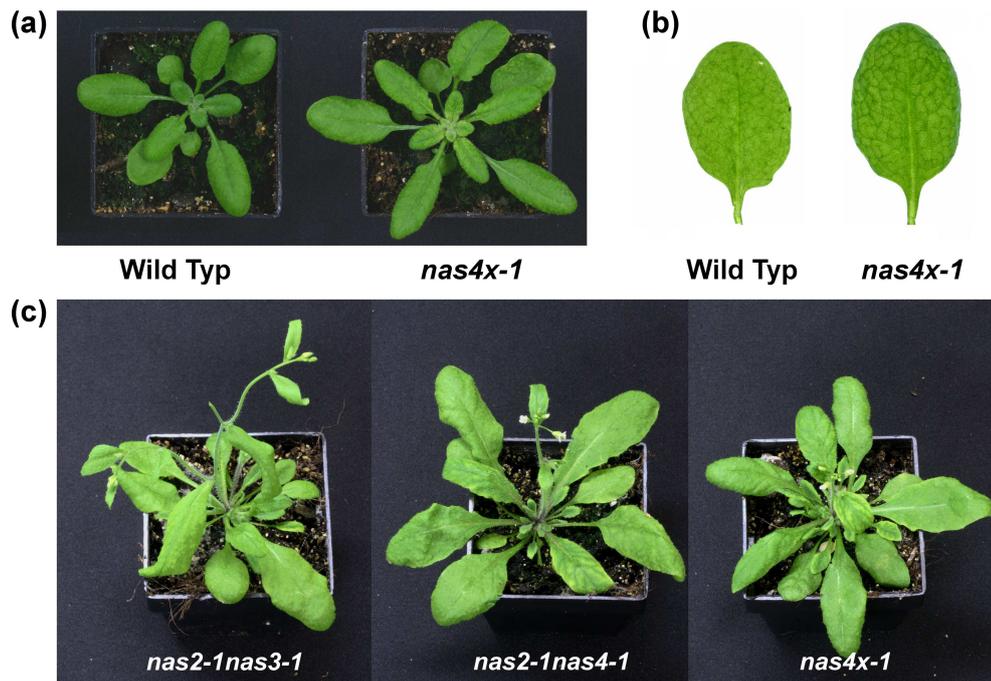


Abbildung 4.10: Phänotypen von *nas* T-DNA Insertionsmutanten auf Erde. (a) Vergleich der *nas4x-1* Mutante mit Wild Typ in der vegetativen Wachstumsphase (Pflanzenalter ca. 3 Wochen). (b) Durchlichtbetrachtung von nicht-chlorotischen Blättern aus (a). (c) Phänotypen der zwei Doppelmutanten *nas2-1nas3-1* und *nas2-1nas4-1* im Vergleich zur *nas4x-1* Mutante im reproduktiven Wachstumsstadium (Pflanzenalter ca. 5-6 Wochen). Erläuterungen siehe Text.

nicht-chlorotischen Blätter im Durchlicht war jedoch auch hier in der *nas4x-1* Mutante ein erhöhter Kontrast zwischen Leitbündeln und Interkostalfeldern zu beobachten, der sich in einer dunkleren Grünfärbung der Leitbündel äußerte (vgl. Abbildung 4.10b). Im reproduktiven Entwicklungsstadium war der Unterschied zwischen Wild Typ und *nas* Mutanten deutlich stärker ausgeprägt. Dabei erwies sich insbesondere das *nas4-1* Allel als besonders wichtig für die Ausprägung des *nas* Phänotyps: sämtliche Mehrfachmutanten mit *nas4-1* waren, mit Ausnahme der *nas4-1* Einfachmutante, stark chlorotisch, während die *nas* Chlorose bei Mehrfachmutanten ohne *nas4-1* schwach oder gar nicht ausgeprägt war. Besonders deutlich wird dieser Umstand im Vergleich des Phänotyps der *nas2-1nas3-1* und *nas2-1nas4-1* Doppelmutanten. Während bei der *nas2-1nas3-1* Doppelmutante keine Chlorose festzustellen war, war die Chlorose der *nas2-1nas4-1* Doppelmutante nahezu gleich stark ausgeprägt wie bei der *nas4x-1* Vierfachmutante (vgl. 4.10c). Der beispielhafte Vergleich zwischen der *nas4-1* Einfachmutante und der *nas2-1nas4-1* Doppelmutante verdeutlicht zudem, dass die *NAS* Gene funktionell zumindest partiell redundant sind. Dass das *nas2-1* Allel in diesem Beispiel zudem eine Verstärkung des *nas* Phänotyps bewirkte, unterstreicht auch die bereits zuvor gemachte Beobachtung, dass das *nas2-1* Allel, trotz der T-DNA Insertion im 5'-UTR und dem damit verbundenen Verlust der Gewebespezifität, zu einer Reduktion der *NAS* Aktivität führte.

4.4.2 Einfluss der *nas* Mutationen auf die Toleranz gegenüber Metallstress

Aus transgenen Pflanzen war bekannt, dass ektopisch exprimiertes *NAS* zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Fe Mangel und Ni Stress führte [Douchkov et al. (2001), Douchkov et al. (2005)]. Im Gegensatz dazu war die NA freie Tomatenmutante *chloronerva* hypersensitiv gegenüber Fe Mangel (vgl. Abschnitt 1.3.1/S.24). Beide Beobachtungen waren Hinweise auf eine Korrelation zwischen Metall bedingter Stresstoleranz und NA Gehalt der Pflanzen.

Mit zunehmender Zahl an *nas* Mutationen in der *nas* T-DNA Kollektion wurde demnach eine sukzessive Abnahme des NA Gehalts und damit eine Zunahme der Sensitivität gegenüber Metallstress erwartet. Durch die differenzielle Expression der *NAS* Gene in Wild Typ wurde zudem auch eine unterschiedlich starke Beteiligung der einzelnen *NAS* Gene an der Ausprägung dieser Metalltoleranz angenommen. Eine Untersuchung der *nas* T-DNA Kollektion unter Metallstress Bedingungen sollte daher zeigen, inwieweit die einzelnen *NAS* Gene für die Ausprägung der Metallstress Toleranz wichtig sind.

In den in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Expressionsstudien bewirkten Fe Mangel und Ni Stress eine überwiegend deutliche Induktion der *NAS* Genexpression, während der getestete Überschuss an Cu, Mn und Zn nur eine leichte *NAS* Induktion zur Folge hatten. Der Fokus der Überprüfung der Metallstress Toleranz der *nas* T-DNA Kollektion lag daher auf Fe Mangel (–Fe) und Ni-Stress (60 µM Ni). Zusätzlich dazu wurde auch die Toleranz gegenüber Zn-Stress (100 µM Zn)³ getestet. Samen der zum Zeitpunkt des Experiments verfügbaren *nas* T-DNA Mehrfachmutanten, es fehlten eine Dreifach- und zwei Doppelmутanten, wurden auf Hoagland Agar unter den entsprechenden Metallstress Bedingungen ausgelegt. Nach drei Wochen Anzucht wurden die durch *nas* Mutationen hervorgerufenen Phänotypen im Vergleich zu Wild Typ untersucht. Die Ausprägung der *nas* Phänotypen nahm tendenziell mit der Zahl der *nas* Mutationen zu und fand in der *nas4x-1* Mutante stets die stärkste Ausprägung. Zur Veranschaulichung der jeweiligen Phänotypen sind daher in Abbildung 4.11 jeweils Wild Typ und *nas4x-1* Mutante gegenüber gestellt.

4.4.2.1 *nas* T-DNA Mutanten waren hypersensitiv gegenüber Fe Mangel

Die Untersuchung von Fe Mangel in Bezug auf die *NAS* Gene auf dem Agarplatten System erwies sich als schwierig. Es war bekannt, dass der verwendete Pflanzenagar Spuren von Fe enthält. Zur Bindung dieser Fe Spuren wurde in der Arbeitsgruppe üblicherweise der Chelator Ferrozine zu dem Medium gegeben. Allerdings war Ferrozine nicht nur ein Chelator von Fe, sondern auch von anderen zweiwertigen Metallionen wie beispielsweise Cu. Um sicher zu stellen, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf

³die Erhöhung der Zn Konzentration auf 100 µM (=50x) im Vergleich zu Abschnitt 4.1.2 (48 µM=24x) beruhte auf einen erneuten Test zur Optimierung der Stressbedingungen, in dem 100 µM Zn einen deutlichen, aber nicht lethalen Phänotyp in Wild Typ ausgelöst hatte.

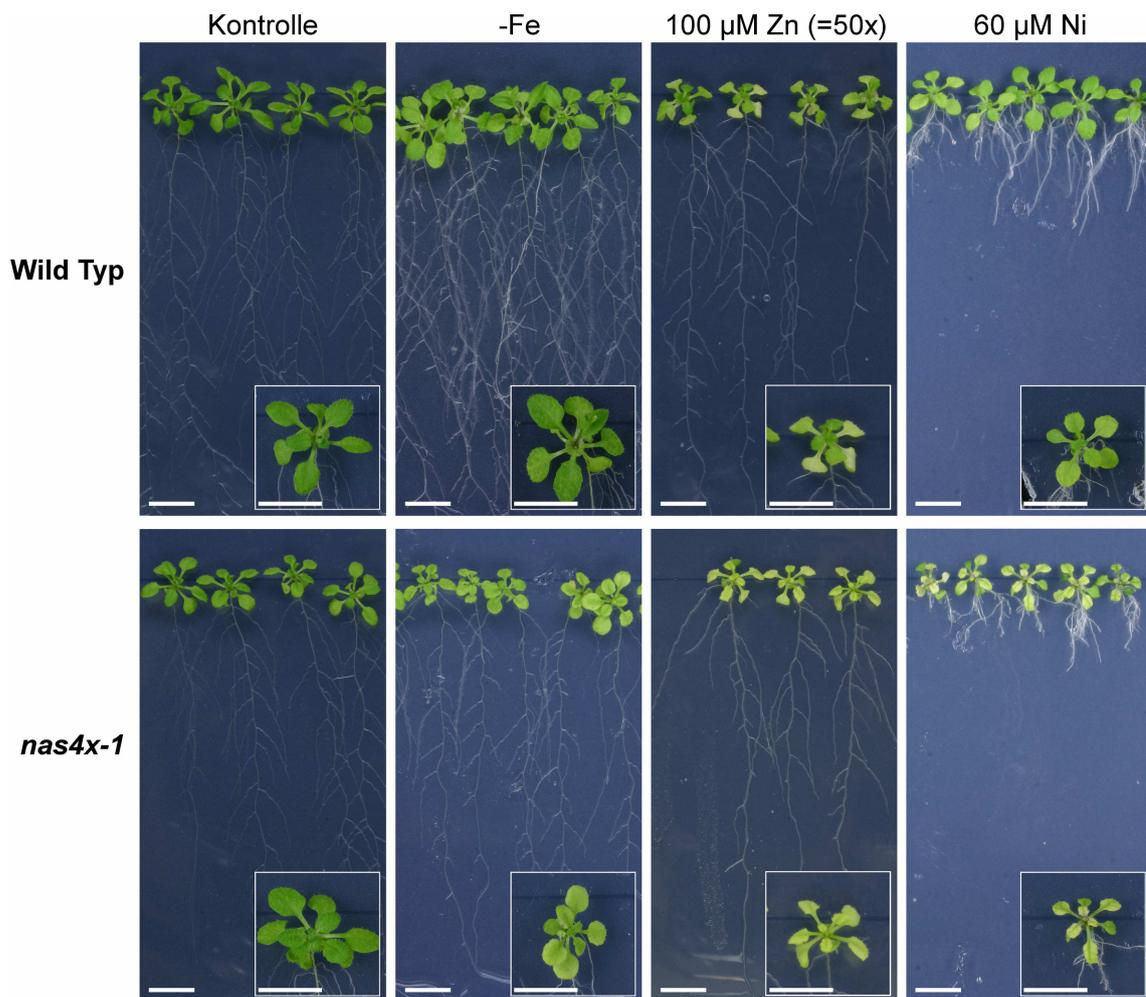


Abbildung 4.11: Phänotypen von *nas* T-DNA Insertionsmutanten unter Metallstress auf Hoagland Agar. Der Vergleich zwischen Wild Typ und *nas4x-1* zeigt den Unterschied im Phänotyp jeweils in seiner stärksten Ausprägung. Die *nas4x-1* Mutante war hypersensitiv gegenüber Fe Mangel sowie Überschuss von Zn und Ni. Nur unter Ni Stress wurde die für NA Mangel typische interkostale Chlorose beobachtet. Größenmaßstab = 1 cm.

Fe Mangel und nicht auf unspezifischen, multiplen Metallmangel zurück zu führen waren, wurde in diesem Experiment bewusst auf die Zugabe von Ferrozine verzichtet und eine geringe Fe Konzentration im Medium in Kauf genommen.

Diese Bedingungen genügten jedoch nicht, um in Wild Typ Pflanzen eine signifikante Fe Mangelchlorose zu induzieren. Lediglich die Wurzelsysteme der Wild Typ Pflanzen zeigten eine vermehrte Bildung von Seitenwurzeln und Wurzelhaaren, was auf eine Erhöhung der Wurzeloberfläche zur Optimierung der Nährstoffaufnahme hindeutet. In *nas* T-DNA Mutanten war dagegen zumindest eine leichte, mit der Zahl der *nas* Mutationen tendenziell zunehmende Chlorose zu beobachten, die allerdings selbst in der *nas4x-1* Mutante nicht über eine hellgrüne, aber gleichmäßig verteilte Färbung der Blätter hinaus ging (vgl. Abbildung 4.11). Angesichts des von der Kontrolle kaum zu unterscheidenden Phänotyps von Wild Typ reichte diese schwache Chlorose jedoch aus, um eine eindeutige Hypersensitivität der *nas* Mutanten gegenüber Fe Mangel festzustellen. Eine Zuordnung, welches *NAS* Allel für die Toleranz von Fe Mangel besonders wichtig war, war aufgrund der geringen Unterschiede jedoch nicht möglich.

4.4.2.2 *nas* T-DNA Mutanten waren leicht hypersensitiv gegenüber Zn Stress

Ähnlich schwach ausgeprägt wie unter Fe Mangel gestaltete sich auch der *nas* Phänotyp unter Zn Stress. Zwar zeigten die *nas* Mutanten im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche, gleichmäßig ausgeprägte Chlorose der älteren und teilweise auch der jüngeren Blätter. Wild Typ Pflanzen wiesen jedoch ebenfalls eine deutliche Chlorose der älteren Blätter auf und unterschieden sich von den *nas* Mutanten daher nur durch den Grad der Grünfärbung junger Blätter (vgl. Abbildung 4.11). Der direkt auf die *nas* Mutationen zurückzuführende Anteil an dem Zn-Stress Phänotyp wurde daher als eher gering eingeschätzt. Dabei wurde auch berücksichtigt, dass in dem eingangs beschriebenen Experiment zur Klärung der differentiellen Expression der *NAS* Gene unter unterschiedlichen Metallstress Bedingungen (Abschnitt 4.1.2/S. 69), die für die Fe Mangelantwort spezifischen Markergene *IRT1* und *FRO2* insbesondere auch unter Zn Stress induziert waren (vgl. Abbildung 4.3/S. 71). Demnach lag bei Zn Überschuss auch ein sekundär induzierter Fe Mangel vor, so dass die leichte Zn Hypersensitivität der *nas* T-DNA Mutanten zumindest teilweise auch auf diesen sekundär induzierten Fe Mangel zurück zu führen sein konnte. Aufgrund der Komplexität und Untrennbarkeit von Zn- und Fe-Homöostase war eine letztendliche Klärung der Ursache der Zn-Hypersensitivität der *nas* T-DNA Mutanten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich.

4.4.2.3 *nas* T-DNA Mutanten waren hypersensitiv gegenüber Ni-Stress

Im Gegensatz zu den beiden vorgenannten Bedingungen, Fe Mangel und Zn-Stress, zeigte sich bei Ni-Stress ein sehr deutlicher Unterschied zwischen Wild Typ und *nas* Mutanten. Wild Typ Pflanzen zeigten unter diesen Bedingungen zwar ein stark eingeschränk-

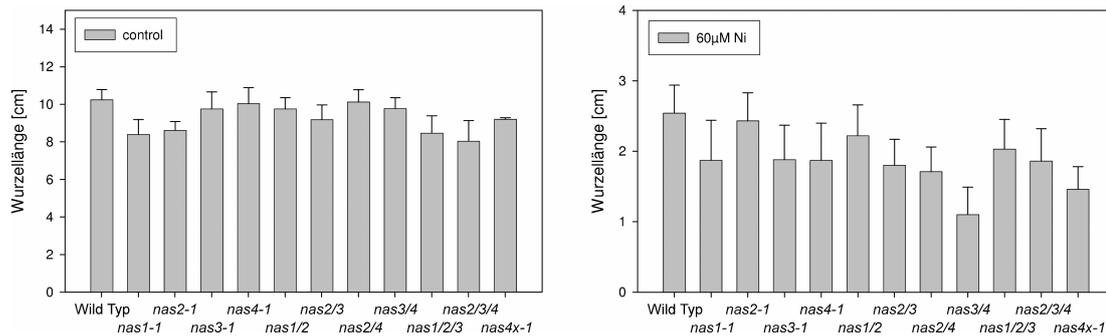


Abbildung 4.12: Quantifizierung des verminderten Wurzelwachstums von *nas* T-DNA Insertionsmutanten unter Ni-Stress. Das *nas4-1* Allel hatte dabei einen besonders negativen Einfluß auf das Wurzelwachstum. Das *nas2-1* hatte dagegen eine entgegengesetzte, das Wurzelwachstum in Mehrfachmutanten fördernde Wirkung. Fehlende *nas* Mutanten waren zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht verfügbar. n = 10.

tes Wurzelwachstum, die Blätter hingegen waren lediglich durch eine gleichmäßig hellgrüne Blattfärbung gekennzeichnet. *nas* Mutanten bildeten dagegen ein breites Spektrum an Blattchlorosen aus, das von hellgrünen Blättern, analog zu Wild Typ (z.B. *nas1-1*), über eine an *chloronerva* erinnernde interkostale Chlorose mit grünen Leitbündel (z.B. *nas4-1*) zu durchgehend gelb-weißlichen, teilweise nekrotischen Blättern (z.B. *nas4x-1*) reichte. In Bezug auf das Wurzelsystem bewirkten die *nas* Mutationen eine im Vergleich zu Wild Typ z. T. stärkere Verkürzung (vgl. Abbildung 4.12). Tendenziell wirkte dabei die Präsenz des *nas2-1* Allels der Verkürzung des Wurzelsystems entgegen, während das *nas4-1* Allel die Verkürzung des Wurzelsystems insbesondere in Kombination mit weiteren *nas* Mutationen verstärkte.

Um die Hypersensitivität der *nas* T-DNA Mutanten gegenüber Ni-Stress näher zu untersuchen, wurde das Experiment zu einem späteren Zeitpunkt mit der vollständigen *nas* T-DNA Kollektion wiederholt. Die Analyse der Pflanzen wurde dabei aber zur Unterbindung von Nekrosen bereits nach 17 Tagen vorgenommen. Zur Quantifizierung der Phänotypen wurde jede Pflanze einzeln bewertet und entsprechend dem Blattphänotyp in eine von drei Kategorien eingeordnet: *Normal sensitiv* (gleichmäßig hellgrün gefärbt), *hypersensitiv* (interkostale Chlorose) und *stark hypersensitiv* (starke interkostale Chlorose mit gelblich-weißen Blättern). Die prozentualen Verteilungen der drei Kategorien innerhalb eines Genotyps wurde in der Folge zur Bewertung der Ni-Sensitivität herangezogen (vgl. Abbildung 4.13).

Normal sensitiv gegenüber Ni-Stress erwiesen sich die Einfachmutanten *nas1-1* und *nas2-1* sowie die Doppelmutanten *nas1-1nas2-1* und *nas1-1nas3-1* (vgl. Abbildung 4.13, grün unterlegt). Diese Mutanten wiesen zu $\geq 80\%$ eine hellgrüne Blattfärbung auf, zeigten nur vereinzelt Ansätze einer interkostalen Chlorose und waren damit praktisch nicht von Wild Typ zu unterscheiden. *Hypersensitiv* gegenüber Ni-Stress waren die Einfachmutante *nas3-1*, die Doppelmutante *nas2-1nas3-1* sowie die Dreifachmutante *nas1-1nas2-1nas3-1* (vgl. Abbildung 4.13, gelb unterlegt). Bei diesen Linien überwogen mit mindestens 55% Pflanzen mit interkostaler Chlorose, wohingegen stark chlorotische Pflanzen nur zu max.

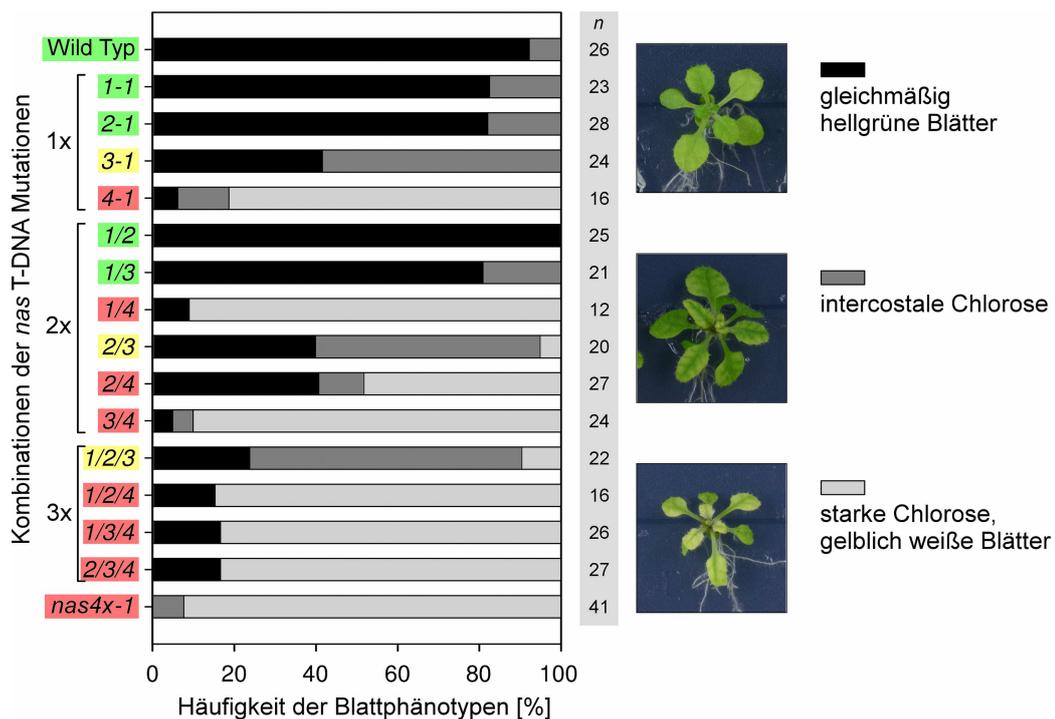


Abbildung 4.13: Bewertung der Ni-Sensitivität der *nas* T-DNA Insertionsmutanten unter Ni-Stress. Einzelpflanzen wurden entsprechend der Legende klassifiziert. Entsprechend der Verteilung der Phänotypen in einer Mutantenpopulation wurden die *nas* T-DNA Insertionsmutanten als *normal sensitiv* (grün), *hypersensitiv* (gelb) oder *stark hypersensitiv* (rot) gegenüber Ni-Stress bewertet.

10 % auftraten. *Stark hypersensitiv* gegenüber Ni-Stress waren die Einfachmutante *nas4-1*, die Doppelmutanten *nas1-1nas4-1*, *nas2-1nas4-1* und *nas3-1nas4-1*, die Dreifachmutanten *nas1-1nas2-1nas4-1*, *nas1-1nas3-1nas4-1* und *nas2-1nas3-1nas4-1* sowie die Vierfachmutante *nas4x-1* (vgl. Abbildung 4.13, rot unterlegt). In diesen Linien betrug der Anteil an stark chlorotischen Pflanzen mit gelblich weißen Blättern mindestens 60 %, mit Ausnahme der *nas2-1nas4-1* Doppelmutante sogar 80 %.

Analog zur Beobachtung des *nas* Phänotyps von auf Erde angezogenen Pflanzen spielte auch in Bezug auf die Ni-Toleranz das *nas4-1* Allel die Schlüsselrolle in der Stärke der Ausprägung des *nas* Phänotyps. Zusätzlich dazu konnte beobachtet werden, dass das *nas2-1* Allel dem *nas4-1* Allel entgegengesetzt zu einer Abschwächung des *nas* Phänotyps in der *nas2-1nas4-1* Doppelmutante führte. In Mehrfachmutanten wie beispielsweise den *nas1-1nas2-1nas4-1* und *nas2-1nas3-1nas4-1* konnte dieser positive Effekt des *nas2-1* Allels auf die Ni Toleranz jedoch nicht beobachtet werden.

4.4.3 Analyse der *NAS* Genexpression unter Ni-Stress

Die Analyse der *nas* T-DNA Kollektion unter Metallstress zeigte, dass NA ein essentieller Faktor in der Resistenz von *A. thaliana* insbesondere gegenüber Ni darstellte. Wie bereits eingangs im Rahmen der Charakterisierung der *NAS* Gene beschrieben, waren die vier

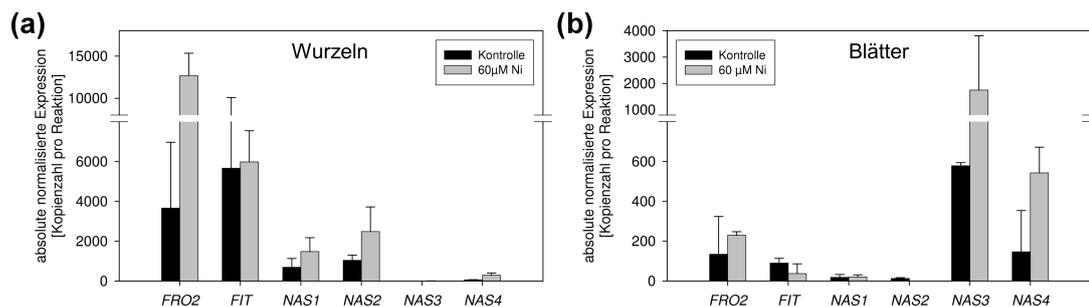


Abbildung 4.14: Expressionsanalyse der *NAS* Gene unter Ni Stress (a) in Wurzeln und (b) in Blättern von Wild Typ. Die Fe Mangel Markergene *FRO2* und *FIT* wurde zur Kontrolle des Fe Status der Pflanzen mit analysiert. n=3.

NAS Gene sowie die Markergene für Fe Defizienz, *FRO2* und *IRT1*, unter Ni-Stress größtenteils deutlich induziert (vgl. Abbildung 4.3 auf Seite 71). Die *NAS* Gene waren demnach direkt an der Ni-Stress Antwort beteiligt. Die bisherigen Daten boten allerdings keine Möglichkeit, die Transkriptmengen der einzelnen Gene untereinander zu vergleichen und somit hierarchische Strukturen innerhalb der *NAS* Genfamilie zu identifizieren. Mit der Etablierung der real-time qPCR, in der Mengenstandards die Quantifizierung absoluter Kopienzahlen der Transkripte pro Reaktion ermöglichten, wurde eine deutlich feinere Analyse der Reaktion der *NAS* Gene auf Ni-Stress möglich. Einzelheiten der Etablierung der real-time qPCR sind in Abschnitt 3.5.2.1 auf Seite 61 beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung der Methode wurde im Mai 2007 zur Publikation eingereicht, akzeptiert und befindet sich derzeit in Druck [Klatte und Bauer (2008)].

Wild Typ (Col-0) Pflanzen wurden zwei Wochen auf Standard Hoagland Agar und 5 weitere Tage auf Hoagland Agar mit 60 µM NiCl₂ angezogen, RNA aus Wurzeln und Blättern gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Neben den Transkripten der vier *NAS* Gene und dem Fe-Chelat Reduktase Gen *FRO2* wurde auch das Transkript des Transkriptionsfaktors *FIT* analysiert. Interessanterweise war *FIT* in Wurzeln von Pflanzen unter Ni-Stress nicht induziert, während die *FRO2* Expression um in etwa das Dreifache zugenommen hatte. Von den *NAS* Genen waren erwartungsgemäß nur *NAS1*, *NAS2* und *NAS4* in Wurzeln exprimiert, wobei quantitativ *NAS2* und *NAS1* deutlich stärker transkribiert wurden als *NAS4*. Im Gegenzug waren *NAS1* und *NAS2* in Blättern sehr schwach bzw. gar nicht exprimiert, während *NAS3* in Blättern das dominierende *NAS* Gen war, das ebenso wie *NAS4* deutlich unter Ni-Stress induziert war. Besonders interessant an diesem Ergebnis ist, dass das *NAS4* Gen, im Ni-Sensitivitätstest als das für die Ni-Toleranz entscheidene *NAS* Gen identifiziert, weder in Wurzeln noch in Blättern in der Transkriptmenge dominierte. Eine über die Transkriptionsebene hinaus gehende Regulation der *NAS* Aktivität, z.B. auf Ebene der Proteinstabilität oder Enzymaktivität, ist eine Möglichkeit, mit der dieser Unterschied erklärt werden kann.

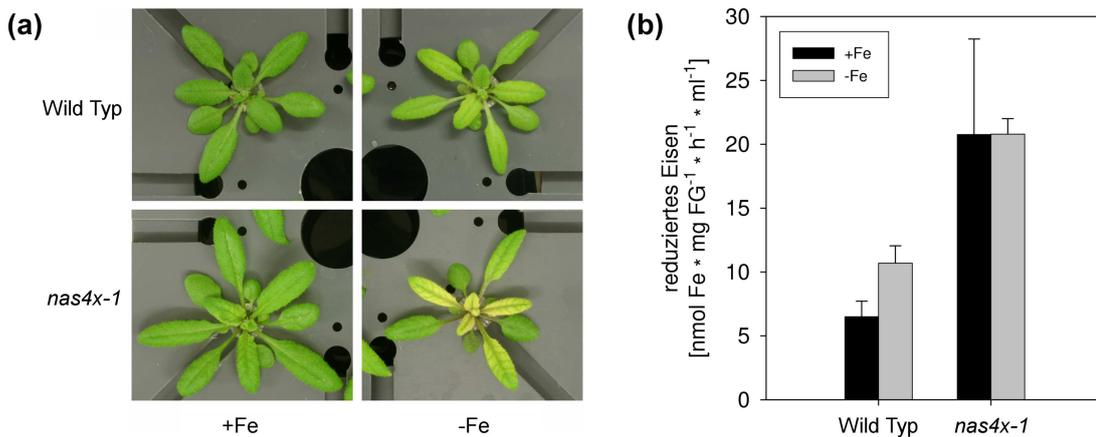


Abbildung 4.15: Bestimmung der Fe Chelat Reduktase Aktivität in der *nas4x-1* Mutante. (a) Phänotypen von Wild Typ und *nas4x-1* unter Kontroll- und -Fe Bedingungen. (b) Vergleich der Fe Chelat Reduktase Aktivität von Wild Typ und *nas4x-1* Mutante. *nas4x-1* zeigte eine konstitutiv hohe Fe Chelat Reduktase Aktivität auch unter Kontrollbedingungen. n=3.

4.4.4 Untersuchungen der *nas4x-1* Mutante im Kontext der Fe Homöostase

Die Reduzierung des NA Gehalts in der *nas4x-1* Mutante bewirkte eine deutliche Sensibilisierung gegenüber Fe Mangel. Auch zeigten Blätter der *nas4x-1* Mutante eine starke Akkumulation von Fe, woraus geschlossen wurde, dass besonders die Fe Homöostase durch den NA Mangel beeinträchtigt war. In der Folge wurde daher der Einfluss des NA Mangels auf die Fe Homöostase im Detail untersucht.

4.4.4.1 Die Aktivität der Fe Chelat Reduktase war in der *nas4x-1* Mutante konstitutiv induziert

Um den Status der Fe Homöostase zu bestimmen, wurde standardmäßig die Aktivität der Fe Chelat Reduktase in einem kolorimetrischen Test bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Wild Typ (Col-0) und *nas4x-1* Pflanzen zunächst im hydroponischen System insgesamt 4 Wochen unter Normalbedingungen ($1/4$ Hoagland, $10 \mu\text{M Fe}$) angezogen und für 5 weitere Tage auf +Fe ($10 \mu\text{M Fe}$) und -Fe ($0 \mu\text{M Fe}$) umgesetzt. Wild Typ entwickelte unter diesen Bedingungen lediglich eine leichte Chlorose, während die *nas4x-1* Mutante eine starke interkostale Chlorose ausbildete (vgl. Abbildung 4.15a).

Erwartungsgemäß zeigte Wild Typ unter Fe Mangel eine im Vergleich zu Kontrollbedingungen induzierte Fe Chelat Reduktase Aktivität. In der *nas4x-1* Mutante war die Aktivität Fe Chelat Reduktase bereits unter Kontrollbedingungen um das 3-4fache im Vergleich zu Wild Typ erhöht und durch Fe Mangel nicht weiter induzierbar (vgl. Abbildung 4.15b).

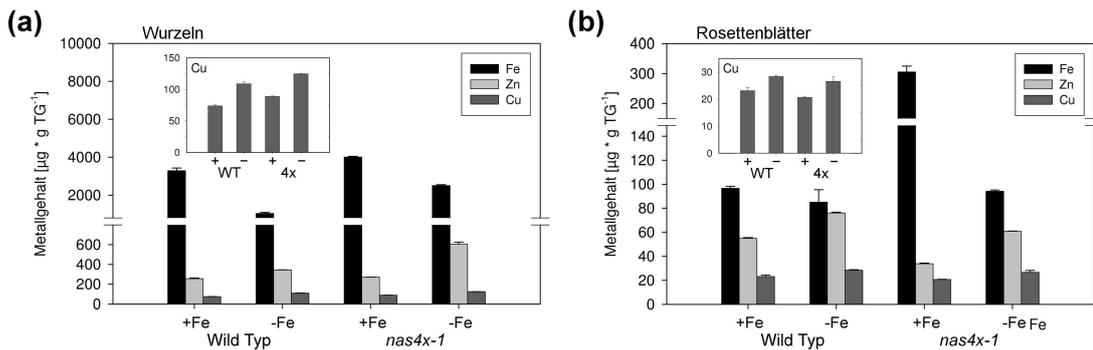


Abbildung 4.16: Bestimmung der Metallgehalte von Wild Typ und *nas4x-1* Mutante unter Fe Mangel (a) in Wurzeln und (b) in Blättern. $n=3$.

4.4.4.2 In Blättern der *nas4x-1* Mutante akkumuliertes Fe wurde unter Fe Mangel remobilisiert und in die Wurzeln translokaliert

Wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, enthielten Blätter der *nas4x-1* Mutante im Vergleich zu Wild Typ in etwa die dreifache Menge Fe. Dies stand im Einklang mit der konstitutiv induzierten Fe Aufnahme in der *nas4x-1* Mutante. Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwiefern sich Fe Mangel auf die Metallgehalte der *nas4x-1* Mutante im Vergleich zu Wild Typ auswirkte.

In Wild Typ bewirkte Fe Mangel erwartungsgemäß eine Reduktion des Fe Gehalts in Wurzeln und Blättern, während die Gehalte an Zn und Cu zunahm (vgl. Abbildung 4.16a+b). Diese wahrscheinlich auf unspezifische Aufnahmemechanismen zurück zu führende Beobachtung wurde im wesentlichen auch in der *nas4x-1* Mutante beobachtet. Allerdings war hier der Anstieg des Zn Gehalts in Wurzeln (+123%) deutlich stärker ausgeprägt als in Wild Typ (+34%). Besonders interessant war aber die Beobachtung, dass der Fe Gehalt in Blättern der *nas4x-1* Mutante unter Fe Mangel binnen 5 Tagen auf das Wild Typ Niveau reduziert wurde. Auf der anderen Seite nahm der Fe Gehalt in Wurzeln der *nas4x-1* Mutante mit –37% annähernd nur halb so stark ab, wie in Wild Typ (–68%). Eine mögliche Erklärung ist, dass das in den Blättern der *nas4x-1* Mutante akkumulierte Fe in remobilisierbarer Form gespeichert war und zur Abpufferung des Fe Mangels auch in die Wurzel verlagert wurde.

4.4.5 Integration der *NAS* Gene in das Netzwerk der Fe Homöostase

Die Integration der *NAS* Gene in das Netzwerk der Fe Homöostase umfasste zwei Aspekte. Zum einen wurde der Einfluss von Fe Mangel auf die *NAS* Genexpression in Wild Typ untersucht, zum anderen die Auswirkung der *nas* Mutationen auf die Genexpression bekannter Gene der Fe Homöostase. Darüber hinaus wurde die Genregulation der drei bislang charakterisierten Mitglieder der *YSL* Genfamilie (*YSL1*, *YSL2* und *YSL3*) im Hinblick auf Fe Mangel und die *nas* Mutationen untersucht, da die von diesen Genen

kodierten Transporterproteine als vermeintliche NA-Metall-Chelat Transporter in vermutlich enger Beziehung zu dem NA Angebot *in planta* standen.

4.4.5.1 Die *NAS* Gene waren durch das Angebot an Fe reguliert

Unter den *NAS* Genen waren *NAS2*, *NAS3* und *NAS4* durch Fe Mangel reguliert und zwar in der Form, dass *NAS2* und *NAS4* bei Fe Mangel induziert waren, während *NAS3*, dessen Transkript nur in Blättern detektiert wurde, durch Fe Mangel reprimiert wurde (vgl. Abbildung 4.17a). *NAS1* hingegen war durch Fe Mangel nicht reguliert, was damit im Gegensatz zu den Proben aus dem Agarplatten System stand, bei denen *NAS1* bei Fe Mangel stets deutlich induziert war (vgl. Abbildung 4.3 / S. 71 und 4.20 / S. 97). Diese Diskrepanz lag möglicherweise in Unterschieden in der Anzucht, insbesondere der im Agarplattensystem dem Medium zugegebenen Saccharose und damit möglicherweise verbundenen Hormoneffekten (z. B. Ethylen), begründet.

In Wurzeln der *nas4x-1* Mutante war die *NAS2* Transkription im Vergleich zu Wild Typ deutlich stärker ausgeprägt (vgl. Abbildung 4.17a+b). Von den anderen *NAS* Genen wurden hingegen keine oder nur sehr geringe Transkriptmengen detektiert. Die Summe der *NAS* Transkripte in den Wurzeln der *nas4x-1* Mutante war trotzdem um rund 26 % (Kontrolle) bzw. 11 % (-Fe) höher als in Wild Typ. Im Gegensatz dazu waren in Blättern der *nas4x-1* Mutante trotz des Verlusts der Gewebespezifität nur sehr geringe Mengen an *NAS2* Transkript detektierbar. Die Summe der *NAS* Transkripte in Blättern der *nas4x-1* Mutante war demnach mit 88 % (Kontrolle) bzw. 95 % (-Fe) im Vergleich zu Wild Typ sehr deutlich reduziert. Während also der Verlust der *NAS1* und *NAS4* Expression in Wurzeln der *nas4x-1* Mutante durch *NAS2* kompensiert werden konnte, war dies in Blättern nicht der Fall. Der Verlust der Gewebespezifität durch die *nas2-1* Mutation wirkte sich demnach auch nicht quantitativ auf die *NAS* Transkriptmengen aus. Daraus folgte die Annahme, dass der Großteil des in der *nas4x-1* Mutante produzierten NA in der Wurzel synthetisiert und von dort ausgehend in den Sproß transportiert wurde.

4.4.5.2 Die Markergene für die Fe Aufnahme waren in der *nas4x-1* Mutante unter Kontrollbedingungen induziert

Die Markergene der Fe Mangelantwort, *FRO2*, *IRT1*, *FIT* und *BHLH100* waren in Wurzeln und *BHLH100* auch in Blättern des Wild Typ unter Fe Mangel erwartungsgemäß induziert (vgl. Abbildung 4.17b). In der *nas4x-1* Mutante war die Expression dieser Gene im Vergleich zu Wild Typ bereits unter Kontrollbedingungen leicht erhöht, was die zuvor aufgestellte Hypothese, die Fe Mangelantwort in der *nas4x-1* Mutante sei konstitutiv induziert, im wesentlichen bestätigte. Allerdings war die Genexpression der Markergene in der *nas4x-1* Mutante durch Fe Mangel noch weiter induzierbar, weshalb nur von einer moderat erhöhten Fe Mangelantwort auf Transkriptionsebene gesprochen werden konnte.

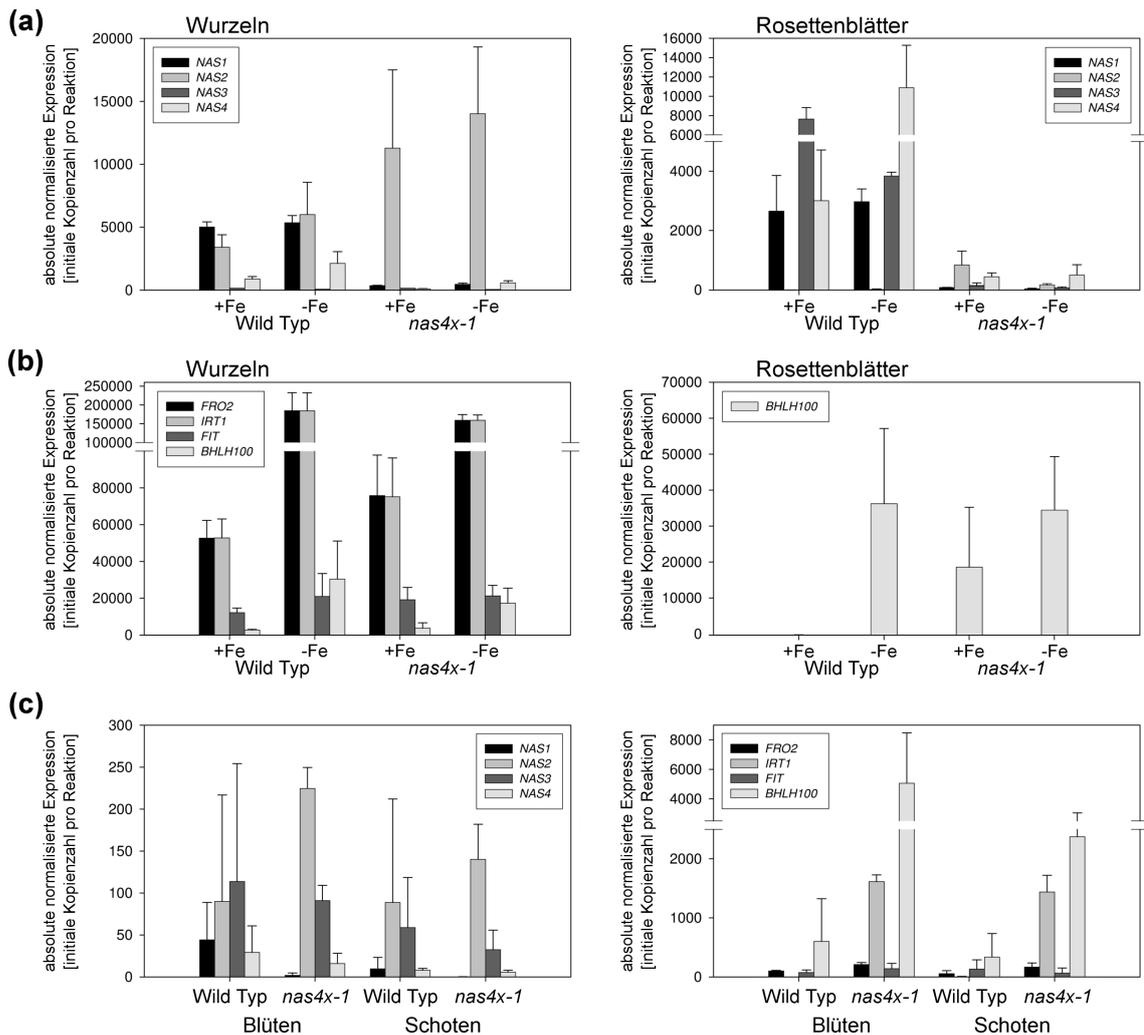


Abbildung 4.17: Vergleichende Expressionsstudien zwischen Wild Typ und *nas4x-1* Mutante im Kontext der Fe Homöostase. **(a+b)** Bestimmt wurde die Expression der vier *NAS* Gene, der Markergene für die Fe Aufnahme, *FRO2*, *IRT1*, sowie der Transkriptionsfaktoren *FIT* und *BHLH100* in Wurzeln und in Rosettenblättern unter Kontroll- und Fe Mangelbedingungen. **(c)** Zusätzlich dazu wurde die Expression dieser Gene in Blüten und Schoten unter Kontrollbedingungen (1/4 Hoagland, hydroponisches System) bestimmt. n=3.

4.4.5.3 In reproduktiven Organen des Wild Typ waren die *NAS* Gene sehr niedrig exprimiert, in der *nas4x-1* Mutante waren *IRT1* und *BHLH100* deutlich induziert.

Zusätzlich zu den vegetativen Geweben Wurzel und Blatt wurde die Expression der genannten Gene auch in den reproduktiven Organen von hydroponisch angezogenen Wild Typ und *nas4x-1* Pflanzen untersucht (vgl. Abbildung 4.17c). Interessanterweise waren die absoluten Transkriptmengen der *NAS* Gene in diesen Geweben auch in Wild Typ sehr niedrig, so dass zwischen Wild Typ und *nas4x-1* Mutante keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Trotz des hohen NA Bedarfs in den reproduktiven Organen beruhte die NA Versorgung der reproduktiven Organe also auf der Translokation des NA aus den vegetativen Organen der Pflanze. Auch zeigte die niedrige *NAS2* Expression in der *nas4x-1* Mutante, dass der zuvor festgestellte Verlust der *NAS2* Gewebespezifität keine quantitativen Auswirkungen auf die *NAS* Genexpression in den reproduktiven Organen hatte.

In Wild Typ waren auch die Markergene für die Fe Mangelantwort nur sehr niedrig oder gar nicht exprimiert. Der Mangel an NA in der *nas4x-1* Mutante bewirkte dagegen eine deutliche Induktion von *BHLH100* und insbesondere *IRT1*, dessen Transkript in Wild Typ nicht detektierbar war. Angesichts des Fe und Zn Mangels in Blüten und Schoten der *nas4x-1* Mutante war dies ein Hinweis auf eine neue, bislang nicht beschriebene Funktion von *IRT1*. Möglicherweise war *IRT1* direkt an der Versorgung der reproduktiven Organe mit Fe und ggf. weiterer Metalle wie z. B. Zn beteiligt.

4.4.5.4 Integration von Mitgliedern der *YSL* Genfamilie im Kontext der Fe Homöostase sowie des NA Mangels in der *nas4x-1* Mutante

Der Mangel an NA zeigte in der *nas4x-1* Mutante vielfältige Auswirkungen auf die Metallgehalte sowie die Genexpression von Markergenen der Fe Homöostase. Die der NA Funktion vermutlich am nächsten stehende Genfamilie war jedoch die der *YSL* Transporter. Diese Annahme wurde insbesondere dadurch gestützt, dass an ihrem Homolog *ZmYS1* aus Mais neben Fe(III)-PS Transport auch Fe(II)-NA Transport gezeigt werden konnte [Curie et al. (2001)]. In den vorgenannten Proben wurde daher auch die Genexpression der drei bislang beschriebenen *YSL* Gene, *YSL1*, *YSL2* und *YSL3* untersucht, die ihrerseits innerhalb der *YSL* Genfamilie die höchste Ähnlichkeit zu *ZmYS1* aufwiesen (vgl. Abbildung 1.9 / S. 30).

Trotz in Wurzeln sehr unterschiedlicher Expressionsstärken bewirkte Fe Mangel stets eine Repression der drei *YSL* Gene, wobei *YSL1* aufgrund seiner sehr niedrigen Expressionsstärke als nicht-exprimiert eingestuft wurde (vgl. Abbildung 4.18a). In der *nas4x-1* Mutante entsprachen die Expressionslevel des stark exprimierten *YSL2* und des moderat exprimierten *YSL3* in etwa denen in Wild Typ bei Fe Mangel, waren unter Fe Mangel in der *nas4x-1* Mutante jedoch nochmals deutlich reprimiert.

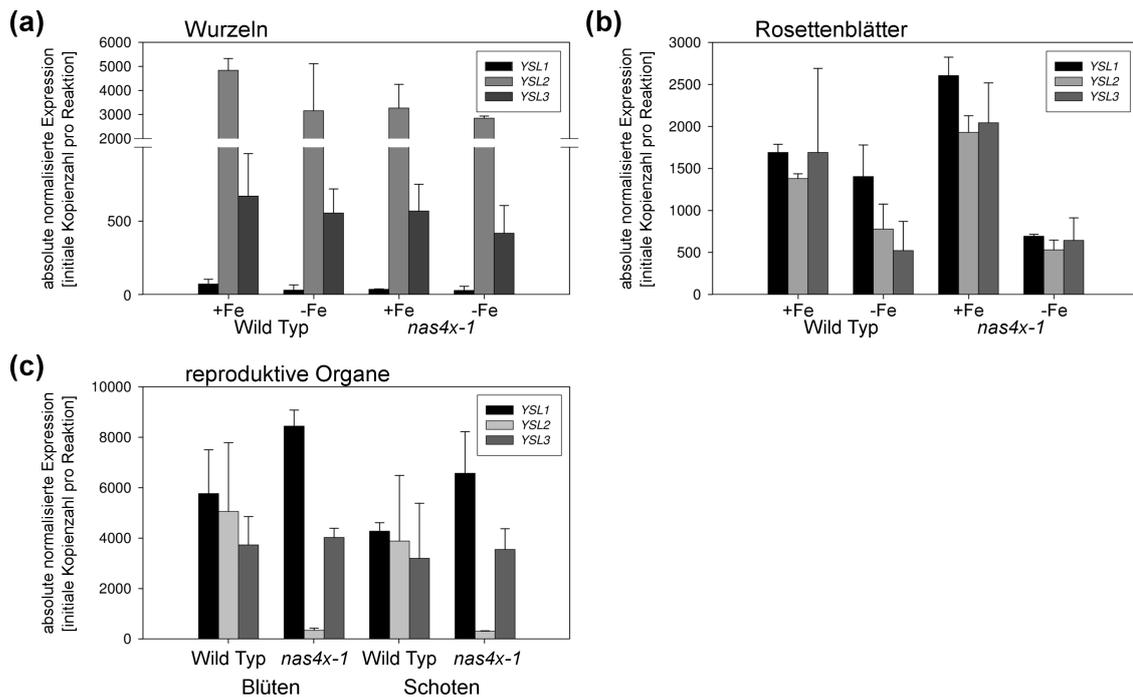


Abbildung 4.18: Vergleichende Expressionsstudien der *YSL* Gene zwischen Wild Typ und *nas4x-1* Mutante im Kontext der Fe Homöostase in **(a+b)** Wurzeln und Blättern unter Fe Mangel und **(c)** in reproduktiven Organen. $n=3$.

In Blättern des Wild Typ bewirkte der Fe Mangel eine deutliche Repression der Genexpression von *YSL2* und *YSL3*, während *YSL1* nur eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der Genexpression zeigte (vgl. Abbildung 4.18b). In Blättern der *nas4x-1* Mutante waren hingegen alle drei *YSL* Gene unter Kontrollbedingungen stärker als in Wild Typ exprimiert, zeigten aber unter Fe Mangel eine ähnlich starke Reduktion der *YSL* Expression wie in Wild Typ. Interessanterweise war im Gegensatz zu Wild Typ auch die Expression von *YSL1* unter Fe Mangel deutlich reprimiert. Da diese Repression unter Fe Mangel in Wild Typ nicht zu beobachten war und auch die Metallgehalte in Blättern der *nas4x-1* Mutante bei Fe Mangel annähernd das Niveau von Wild Typ hatten (vgl. Abbildung 4.16 / S. 90), wurde ein direkter Zusammenhang zwischen *YSL1* Expression und NA Mangel in der *nas4x-1* Mutante angenommen.

Einen noch deutlicheren Zusammenhang zwischen *nas* Mutationen und *YSL* Genregulation ergab die Untersuchung der reproduktiven Organe unter Kontrollbedingungen (hydroponisches System, Langtagbedingungen). Sowohl in Blüten als auch in Schoten der *nas4x-1* Mutante war die Expression von *YSL1* deutlich induziert, während die Expression von *YSL2* drastisch reprimiert war (vgl. Abbildung 4.18c). *YSL1* schien daher eine die reproduktiven Gewebe mit Metallen und NA versorgende Funktion zu erfüllen, während *YSL2* möglicherweise den in der *nas4x-1* Mutante unerwünschten Metalltransport in parenchymatische Gewebe der Blüten und Schoten vermittelte.

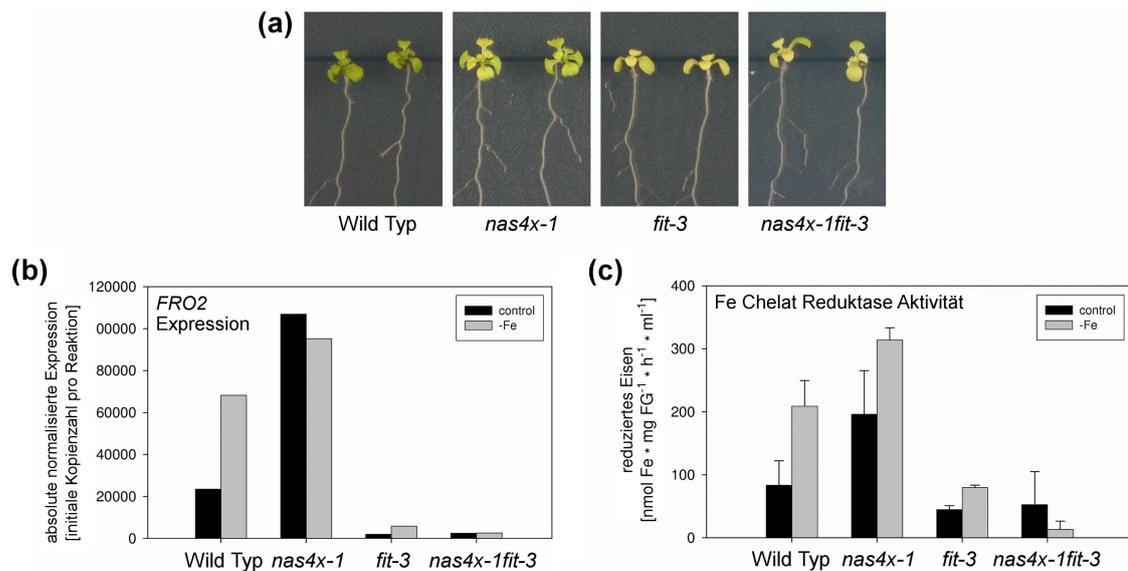


Abbildung 4.19: Charakterisierung der *nas4x-1fit-3* Fünffachmutante im Kontext der Fe Homöostase. **(a)** Phänotypen ca. zwei Wochen alter, auf Hoaglandagar angezogener Pflanzen. **(b)** Colorimetrische Bestimmung der Fe Chelat Reduktase Aktivität in den Mutanten. **(c)** Vergleich der Expression des *FRO2* Gens. (Ergebnisse: M. Schuler, nicht veröffentlicht).

4.5 Genetische Interaktion zwischen den *NAS* Genen und *FIT*

Mit der *nas4x-1* Mutante lag eine neue Mutante in *A. thaliana* vor, in der die Regulation der Fe Homöostase in der Form beeinträchtigt war, dass die Fe Aufnahme im Vergleich zu Wild Typ konstitutiv induziert war. Die entgegengesetzte Auswirkung auf die Fe Homöostase, nämlich eine nicht induzierbare Fe Mangelantwort, zeigte die *fit-3* Mutante, die ihrerseits einen Defekt in der Expression des Transkriptionsfaktors FIT hatte. Im folgenden wurde daher die Interaktion der *NAS* Gene mit *FIT* untersucht, um eine Einordnung der *NAS* Gene in die Regulation der Fe Homöostase vornehmen zu können.

4.5.1 Charakterisierung einer *nas4x-1fit-3* Fünffachmutante

Zur Klärung, in welchem regulatorischen Zusammenhang die *NAS* Gene in Bezug auf die maßgeblich durch *FIT* regulierte Fe Homöostase standen, wurde die *nas4x-1* Mutante mit der *fit-3* Mutante gekreuzt. Samen positiver F1 Pflanzen, heterozygot für die vier *nas* Mutationen sowie die *fit-3* Mutation, wurden Fr. M. Schuler zur Isolierung und Analyse im Rahmen ihrer Diplomarbeit überlassen.

In Abbildung 4.19a sind die Phänotypen von ca. zwei Wochen alten Wild Typ, *nas4x-1*, *fit-3* und *nas4x-1fit-3* Pflanzen dargestellt. Während die *nas4x-1* Mutante unter Kontrollbedingungen dem Wild Typ ähnelte, zeichnete sich die *fit-3* Mutante durch eine verzögerte Entwicklung sowie eine deutlich ausgeprägte Chlorose der Primärblätter aus. Der Phänotyp der *nas4x-1fit-3* Mutante entsprach dabei weitgehend der *fit-3* Mutante. Um den Status der Fe Homöostase genauer zu untersuchen, wurde die Genexpression des

FRO2 Gens sowie die enzymatische Aktivität der Fe Chelat Reduktase unter Kontroll- und Fe Mangelbedingungen untersucht (vgl. Abbildung 4.19b+c). Während die *nas4x-1* Mutante unter beiden Bedingungen eine im Vergleich zu Wild deutlich induzierte *FRO2* Expression bzw. *FRO2* Aktivität aufwies, war die *fit-3* Mutante erwartungsgemäß nicht in der Lage, *FRO2* bzw. *FRO2* zu induzieren. Die *nas4x-1fit-3* Fünfachmutante ähnelte auch in diesem Bezug der *fit-3* Mutante, d. h. sie war nicht in der Lage, *FRO2* bzw. *FRO2* zu induzieren. Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, dass das *FIT* Gen epistatisch zu den *NAS* Genen im Netzwerk der Regulation der Fe Homöostase wirkt.

4.5.2 Untersuchung der *NAS* Genexpression in Abhängigkeit von *FIT*

Um eine direkte Verbindung zwischen den *NAS* Genen und *FIT* herzustellen, wurde die *NAS* Genexpression in cDNA Proben der *fit-3* knock-out Mutante sowie einer *FIT* überexprimierenden Linie (*p2xCaMV35S::FIT*) bestimmt⁴ (vgl. Abbildung 4.20). Der Effekt der *FIT* überexprimierenden Linie war dabei dem der *fit-3* Mutante entgegengesetzt und bewirkte insbesondere den Verlust der Gewebespezifität von *FRO2* und *IRT1*, die unter Fe Mangel untypischerweise auch in Blättern exprimiert waren. Die Exklusivität der Genexpression unter Fe Mangel machte auch deutlich, dass nicht die *FIT* Expression allein, sondern auch der Fe Status der Pflanze regulierend auf die Expression von *FRO2* und *IRT1* wirkte.

In Wurzeln des Wild Typ waren unter Fe Mangel *NAS2*, *NAS4* und interessanterweise besonders auch *NAS1* induziert, während *NAS3* nicht detektierbar war. In Blättern dominierte die Expression von *NAS4*, während *NAS3* auch in diesen Proben nur sehr niedrig exprimiert war. Diese im Vergleich zum hydroponischen System offensichtlich stark abweichenden *NAS* Expressionsmuster wurden mit Unterschieden im Anzuchtssystem, insbesondere dem Zusatz von 1 % Saccharose sowie Ferrozin (Fe Mangel), begründet. Nichtsdestotrotz konnte in diesen Proben festgestellt werden, dass in Wurzeln der *fit-3* Mutante *NAS1*, *NAS2* und *NAS4* nicht mehr unter Fe Mangel induziert werden konnten. Im Gegensatz dazu bewirkte die Überexpression von *FIT* in Wurzeln nur eine Induktion von *NAS1*. In Blättern der *fit-3* Mutante war besonders *NAS4* reprimiert und unter Fe Mangel nicht induziert. Interessanterweise bewirkte in Blättern auch die Überexpression von *FIT* eine Repression von *NAS4*, während *NAS1*, normalerweise nicht oder nur schwach in Blättern exprimiert, sehr stark induziert war.

Zusammengefasst konnte also eine Abhängigkeit der *NAS1*, *NAS2* und *NAS4* Expression von *FIT* beobachtet werden. Insbesondere *NAS1* zeigte eine direkte Abhängigkeit von *FIT*, da es ähnlich wie *FRO2* und *IRT1* sowohl in der *fit-3* Mutante reprimiert als auch in der *FIT* überexprimierenden Linie unter Fe Mangel, einhergehend mit dem Verlust der Gewebespezifität, auch in Blättern stark induziert war. Aufgrund der niedrigen

⁴Beschreibung der Linien siehe [Jakoby et al. (2004)], die cDNA Proben wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Hong-Yu Wang zur Verfügung gestellt.

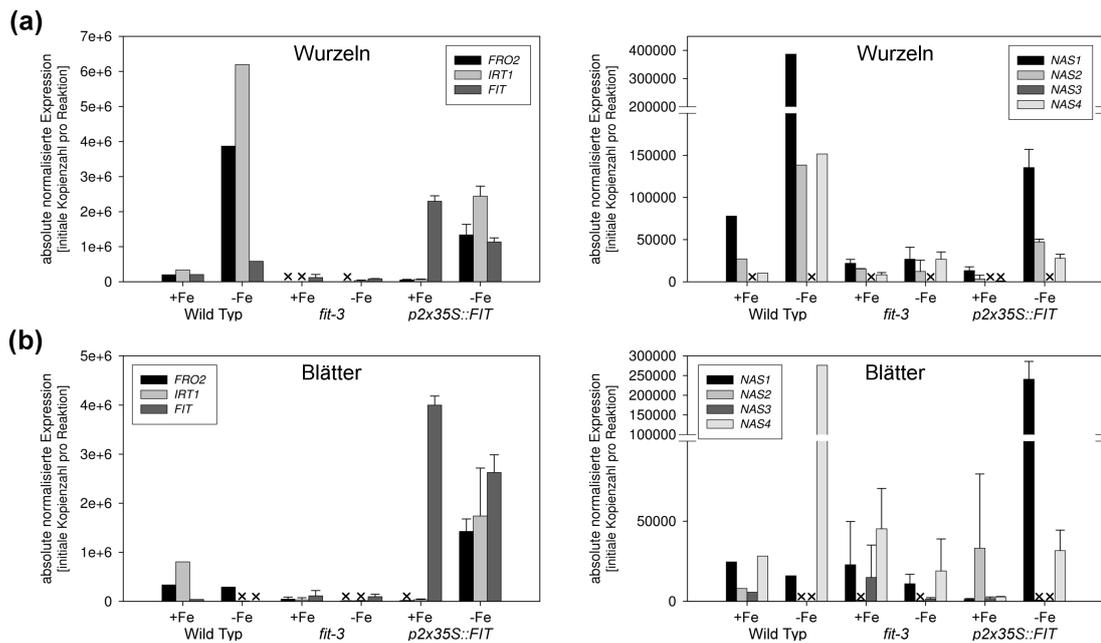


Abbildung 4.20: Abhängigkeit der *NAS* Genexpression von *FIT* im Kontext der Fe Homöostase. Die Expression der *NAS* Gene sowie der Markergene der Fe Aufnahme, *FRO2*, *IRT1* und *FIT*, wurde in Wild Typ, der *fit-3* knock-out Mutante sowie der *FIT* überexprimierenden transgenen Linie *p2x35S::FIT* in (a) Wurzeln und (b) Blättern untersucht. x = nicht oder nur sehr schwach exprimiert.

Expressionslevel von *NAS3*, konnte in diesen Proben keine Abhängigkeit von *NAS3* zu *FIT* festgestellt werden.

4.6 Austausch des *nas2-1* Allels - Generierung der *nas4x-2* Mutante

Zu dem Zeitpunkt, als die 10% NA Restgehalts in Blättern der *nas4x-1* Mutante im vegetativen Entwicklungsstadium festgestellt wurden, waren die Analysen an der *nas4x-1* Mutante schon deutlich vorangeschritten. Trotz der viel versprechenden Ergebnisse wurde beschlossen, das *nas2-1* Allel durch ein in der Zwischenzeit isoliertes Allel mit einer T-DNA Insertion im Exon des *NAS2* Gens auszutauschen. Neben der Möglichkeit, eine tatsächlich NA freie *Arabidopsis* Mutante zu generieren, war dieser Schritt auch notwendig, um eine *nas* T-DNA Kollektion zu erzeugen, in der die Funktionen der vier *NAS* Gene zukünftig frei von Sekundäreffekten analysiert werden konnte.

Die aus der SALK Kollektion stammende, neu isolierte T-DNA Insertionslinie *nas2-2* (vgl. Abbildung 4.21a) wurde daher mit der *nas4x-1* Mutante gekreuzt und analog zum Kreuzungsschema in Abbildung 4.5 / S. 75 eine neue heterozygote *nas4x-2* Mutante in der F1 Generation isoliert. 172 Individuen der F2 Generation wurden mittels genomischer PCR auf Rekombinationsereignisse zwischen *NAS* Allelen auf dem selben Chromosom untersucht. Zum Austausch der *nas* T-DNA Mehrfachmutanten mit *nas2-1* Allel wurden

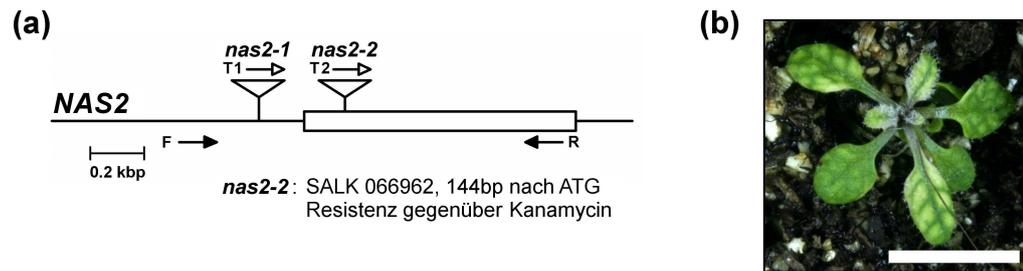


Abbildung 4.21: Integration des *nas2-2* Allels in die *nas* T-DNA Kollektion. **(a)** Darstellung der T-DNA Insertion des *nas2-2* Allels im Vergleich zur Position des *nas2-1* Allels. Geschlossene Pfeile kennzeichnen die Positionen der auf der genomischen DNA hybridisierenden genotypisierungs Primer (F = forward, R = reverse). Die stets am LB der T-DNA befindlichen T-DNA Primer (T, offene Pfeile) kennzeichnen die Orientierung der T-DNA im Genom. **(b)** Erste Aufnahme einer homozygoten *nas4x-2* Mutante. Maßstab = 0,5 cm (Photo: M. Schuler, nicht veröffentlicht).

solche Pflanzen isoliert, bei denen nach erneuter Selbstung in der F3 Generation reinerbige Mehrfachmutanten mit dem *nas2-2* Allel zu erwarten waren. Ein kompletter Satz an Samen, mit denen eine *nas2-1* freie *nas* T-DNA Kollektion generiert werden kann, befindet sich derzeit in der weiteren Bearbeitung durch Fr. M. Schuler.

Erste Ergebnisse der aus diesen Samen isolierten homozygoten *nas4x-2* Mutante zeigen, dass diese Mutante auf Erde angezogen neben einer äusserst geringen Größe auch einen im Vergleich zur *nas4x-1* Mutante deutlich stärkeren *nas* Phänotyp aufwies (vgl. Abbildung 4.21b). Dieser Phänotyp konnte durch die Applikation einer NA Lösung auf die Blätter so weit normalisiert werden, dass Samen der homozygoten *nas4x-2* Mutante gewonnen werden konnten. Die Samenausbeute war allerdings sehr gering, so dass derzeit anzunehmen ist, dass die *nas4x-2* Mutante ohne externe NA Applikation ähnlich wie die Tomatenmutante *chloronerva* zumindest in hohem Maße steril ist (Ergebnisse: M. Schuler, nicht veröffentlicht).

5 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Integration von Nicotianamin in das Netzwerk der Metallhomöostase in *A. thaliana*. Neben der Charakterisierung der *NAS* Genregulation wurde dabei v. a. eine *nas* T-DNA Kollektion generiert und damit in *A. thaliana* erstmals die Möglichkeit geschaffen, die Funktionen von Nicotianamin mit den Mitteln der reversen Genetik zu untersuchen. Insbesondere die Analyse der *nas4x-1* Mutante mit einem in Blättern um 90 % reduzierten NA Gehalt ermöglichte dabei neue Einblicke in die Rolle des Nicotianamin bzw. der Nicotianamin Synthasen in der Metall Homöostase. Im folgenden werden die erzielten Ergebnisse in ihrer biologischen Bedeutung in den Gesamtkontext der Metallhomöostase in *A. thaliana* eingeordnet.

5.1 Charakterisierung der *NAS* Genfamilie

Zu Beginn der Arbeit waren insgesamt drei *NAS* Gene in *A. thaliana* bekannt [[Suzuki et al. \(1999\)](#)]. Die Identifikation eines vierten *NAS* Gens (*NAS4*, At1g56430) im Rahmen der Analyse der zwischenzeitlich veröffentlichten Genomsequenz von *A. thaliana* erweiterte die *NAS* Genfamilie auf vier Mitglieder. Trotz der hochgradigen Konservierung der *NAS* Gene untereinander zeigte sich, dass die vier *NAS* Gene nur teilweise funktionell redundant sein konnten. So war jedes der einzelnen *NAS* Gene in Bezug auf die untersuchten Organe (Wurzeln, Blätter, Blüten und Schoten) unterschiedlich exprimiert (Abb. 4.2 / S. 70). Auch die Analyse der *NAS* Genexpression unter unterschiedlichen Metall-Stress Bedingungen zeigte eine zumindest teilweise differentielle Regulation der *NAS* Genfamilie (Abb. 4.3 / S. 71). Unter Fe Mangel sowie Cu-, Mn- und Zn-Überschuss waren *NAS1*, *NAS2* und *NAS4* jeweils induziert und unter Fe Überschuss reprimiert. Im Gegensatz dazu war das in Blättern exprimierte *NAS3* genau entgegengesetzt reguliert und bei Fe Überschuss induziert. Die entgegengesetzte Regulation von *NAS3* und *NAS4* in Blättern impliziert die Beteiligung dieser *NAS* Gene in zwei unterschiedlichen Aspekten der Fe Homöostase, nämlich der Speicherung und der Remobilisierung von Fe. So ist durchaus denkbar, dass *NAS3* regulatorisch an Prozesse gekoppelt ist, die bei ausreichender Fe Versorgung den Fe Transport in Richtung intrazelluläre Speicherung forcieren. Ebenfalls unter Fe Mangel reprimiert und Fe Überschuss induziert sind die in vaskulären Parenchymzellen der Wurzeln, Blätter und z. T. in den reproduktiven Organe

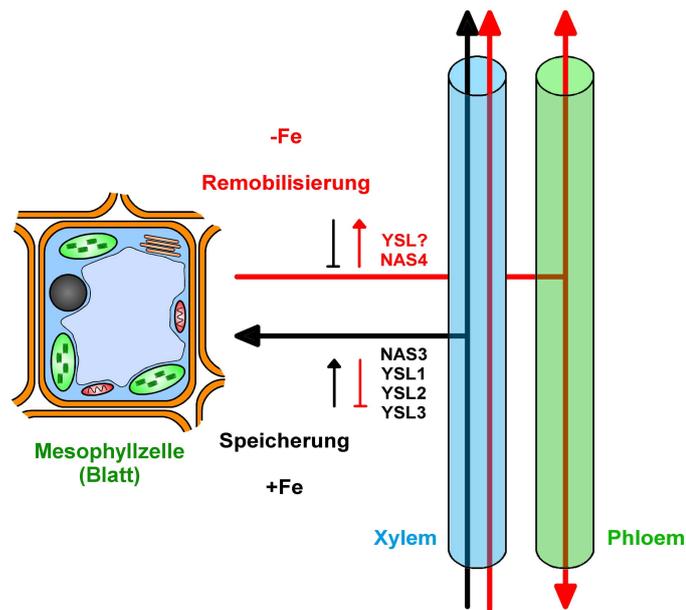


Abbildung 5.1: Hypothetisches Modell über die Speicherung und Remobilisierung von Fe in Blättern mit Fokus auf die Regulation von *NAS* und *YSL*. Bei ausreichender Versorgung mit Fe (schwarz) erfolgt der Transport des Fe aus dem Xylem heraus in Richtung Mesophyll, wo es beispielsweise im Phytoferritin der Chloroplasten gespeichert wird. Unter diesen Bedingungen sind *NAS3*, *YSL1*, *YSL2* und *YSL3* induziert und *NAS4* reprimiert. Unter Fe Mangel (rot) wird in den Mesophyllzellen gespeichertes Fe remobilisiert und über das Phloem in Richtung bedürftiger Organe verlagert. Unter diesen Bedingungen ist die Regulation der genannten *NAS* und *YSL* Gene umgekehrt.

exprimierten, für potentielle NA-Fe(II) Transporter kodierend *YSL* Gene [DiDonato et al. (2004), Le Jean et al. (2005), Schaaf et al. (2005)]. Aus der Lokalisation und Regulation der *YSL* Gene wurde eine Funktion der *YSL* Proteine in dem Transport von NA-Fe(II) Chelat aus dem Xylems abgeleitet [DiDonato et al. (2004), Waters et al. (2006)].

Unter Fe Mangel würde entsprechend dem erhöhten Fe Bedarf der Pflanze die Transportrichtung des Fe umgedreht und in den Blättern gespeichertes Fe remobilisiert, ein Prozess, an den möglicherweise die Regulation von *NAS4* gekoppelt ist. Inwiefern die beiden entgegengesetzten, in Abbildung 5.1 dargestellten physiologischen Aspekte tatsächlich den Einsatz von zwei unterschiedlichen *NAS* Proteinen erfordern, ist angesichts der Tatsache, dass NA frei in der Pflanze transportiert werden kann, nur schwer zu beantworten. Eine mögliche Begründung wäre beispielsweise eine den jeweiligen Aufgabengebieten entsprechende, zelluläre oder subzelluläre Lokalisation und Regulation der NA Synthese. Somit würde NA jeweils direkt dort produziert, wo es in der jeweiligen physiologischen Situation benötigt wird.

Eine der Fe Aufnahme gegenläufige *NAS* Genregulation wie bei *NAS3* wurde interessanterweise auch bei den überwiegend in Blättern, aber auch in Wurzeln exprimierten *ZmNAS3* und *OsNAS3* Genen aus Mais und Reis beobachtet. [Mizuno et al. (2003), Inoue et al. (2003)]. *ZmNAS3* und *OsNAS3* bilden gemeinsam mit *HvNAS9* (Synonym: *NASHOR2*) eine Gruppe an *NAS* Proteinen in Gramineen (Strategie II), deren Sequenz

die größte Ähnlichkeit zu den NAS Proteinen der Nicht-Gramineen (Strategie I) aufweist (Abb. 1.8 / S. 29). Da die entsprechenden NAS Gene bei Fe Mangel reprimiert sind, ist eine Beteiligung an der Synthese der Phytosiderophore und damit der Strategie II der Fe Aufnahme unwahrscheinlich. In Bezug auf die Evolution der NAS Gene im Pflanzenreich könnten diese Beobachtungen ein Hinweis darauf sein, dass die Strategie II der Fe Aufnahme eine jüngere Errungenschaft in der Evolution der Gramineen ist. Für diese Vermutung spricht auch, dass Gramineen durchaus auch Komponenten der Strategie I der Eisenaufnahme aufweisen [Bughio et al. (2002), Ishimaru et al. (2006)], während in Nicht-Gramineen bislang keine Elemente der Strategie II der Eisenaufnahme nachgewiesen werden konnten.

Die Regulation der NAS Gene in *A. thaliana* unter Fe Mangel offenbarte auch Unterschiede zwischen den Anzuchtssystemen auf Agarplatten und im hydroponischen System. *NAS1* war nicht im hydroponischen System, wohl aber im Agarplatten System durch Fe Mangel induzierbar und ähnlich wie *FRO2* und *IRT1* abhängig von FIT (Abb. 4.17 / S. 92, Abb. 4.20 / S. 97). Auf Agarplatten angezogene *nas* Mutanten waren zudem auch nicht chlorotisch. Dieser Unterschied ist möglicherweise mit der dem Agar zugefügten Saccharose (1 %, w/v) zu erklären und wird in Abschnitt 5.3.2 im Kontext der NAS Regulation näher diskutiert.

5.2 Generierung und Bewertung der *nas4x-1* Mutante

Ein Hauptziel der Arbeit war die Generierung einer *nas* T-DNA Kollektion in *A. thaliana*, auf deren Grundlage breit angelegte, auf reverse Genetik basierende Studien aufbauen sollten. Durch gezieltes Kreuzen identifizierter und verifizierter *nas* T-DNA Mutanten wurde so eine 15 Genotypen umfassende *nas* T-DNA Kollektion mit 1x, 2x, 3x und 4x *nas* Mutanten geschaffen (Abb. 4.4b / S. 72, Abb. 4.5 / S. 75). Während die Mutationen *nas1-1* und *nas3-1* durch die Lokalisierung der T-DNA Insertion im 5'-Bereich der NAS Gene als viel versprechende knock-out Mutanten galten, waren *nas2-1* und *nas4-1* durch eine ungünstigere Positionierung der T-DNA im 5'-UTR (*nas2-1*) und wenige Basen vor dem Stop Codon (*nas4-1*) unsichere Kandidaten.

Die *nas4-1* Mutation hatte in der Analyse der *nas* T-DNA Kollektion den stärksten Effekt aller *nas* Mutationen auf die Ausprägung des *nas* Phänotyps. Im Gegensatz dazu konnte *NAS2* als einziges NAS Volllänge cDNA in der *nas4x-1* Mutante nachgewiesen werden. Der Nachweis der in Wild Typ wurzelspezifischen *NAS2* Expression in Blättern, Blüten und Schoten der *nas4x-1* Mutante deutete zudem auf einen Verlust der Gewebespezifität und damit einen funktionellen Zugewinn von *NAS2* hin (Abb. 4.6 / S. 77). Auf Ebene der Genexpression zeigte sich jedoch, dass trotz qualitativen Verlusts der Gewebespezifität die *NAS2* Transkription in der *nas4x-1* Mutante im wesentlichen auf die Wurzeln beschränkt war. Die *NAS* Transkription in reproduktiven Organen war zudem insgesamt sehr niedrig (Abb. 4.17 / S. 92). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass der

Großteil des in der *nas4x-1* Mutante produzierten NA in der Wurzel synthetisiert und von dort in die Pflanze verteilt wurde.

Auch die Bestimmung der NA Gehalte in vegetativen Blättern und Samen widersprach der Möglichkeit, dass durch den Verlust der Gewebespezifität die *nas2-1* Mutation ein funktioneller Zugewinn vorlag. In direktem Vergleich zur *nas1-1nas3-1nas4-1* (*nas134*) Mutante mit Wild Typ *NAS2* Allel enthielt die *nas4x-1* Mutante jeweils weniger NA. In vegetativen Blättern der *nas134* Mutante war der NA Gehalt um 62 % reduziert, während in der *nas4x-1* Mutante eine 90%ige Reduktion beobachtet wurde. Da der Unterschied von 28 % allein auf das *nas2-1* Allel zurück zu führen war, war auch die qualitative Aussage möglich, dass das *nas2-1* Allel eine im Vergleich zu Wild Typ ca. 75%ige Reduzierung der NA Synthese bewirkte (Abb. 4.8 / S. 79).

Trotz der deutlichen Reduktion des NA Gehalts war es der *nas4x-1* Mutante möglich, ihren Lebenszyklus zu vollenden. Weder die Blütenbildung noch die Samenausbeute oder die Keimungsraten von Pollen oder Samen waren durch die *nas* Mutationen in der *nas4x-1* Mutante beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde gegen Ende der Arbeit die neu identifizierte *nas2-2* T-DNA Insertionslinie in die *nas4x-1* Mutante eingekreuzt. Positive Mutanten der F1 und F2 Generation wurden so weit selektiert, dass in der F3 Generation sämtliche das *NAS2* Gen betreffende *nas* T-DNA Kombinationen in der *nas* T-DNA Kollektion homozygot mit dem *nas2-2* Allel isoliert werden konnten. Die aus diesen Samen isolierte *nas4x-2* Mutante unterschied sich von der *nas4x-1* Mutante v. a. durch einen deutlich stärker ausgeprägten *nas* Phänotyp sowie einer trotz regelmäßiger NA Supplementation sehr geringen Samenausbeute (M. Schuler, nicht veröffentlicht). Nach heutigem Wissenstand ist daher von einer sehr wahrscheinlichen Sterilität der *nas4x-2* Mutante auszugehen (Abb. 4.21 / S. 98).

Zusammengenommen lag mit der *nas4x-1* T-DNA Mutante eine *nas knock-down* Mutante vor, die nur in sehr geringem Maße NA zu synthetisieren in der Lage war. Wie die folgenden Abschnitte zeigen, wirkte sich der nicht voll ausgeprägte NA Mangel dennoch deutlich auf die Physiologie der *nas4x-1* Mutante aus und zeigte deutliche Parallelen zu den Beobachtungen an der NA freien Tomatenmutante *chloronerva*. Allerdings war die *nas4x-1* Mutante im Gegensatz zu *chloronerva* in der Lage, ihren Lebenszyklus zu vollenden und uneingeschränkt Samen zu produzieren. Gerade dieser Umstand erwies sich jedoch als großer Vorteil, da so in der *nas4x-1* Mutante erstmals Untersuchungen des NA Mangels an intakten reproduktiven Organen möglich ist.

5.3 Der Einfluss des NA Mangels auf die Physiologie der *nas4x-1* Mutante

Bei Anzucht auf Erde und im hydroponischen System, nicht aber im Agarplattensystem, zeigten die einzelnen Linien der *nas* T-DNA Kollektion eine mehr oder weniger stark ausgeprägte interkostale Chlorose (Abb. 4.10 / S. 82, Abb. 4.7 / S. 78). Der Grad der Ausprägung hing dabei stark von der Zahl der *nas* Mutationen, insbesondere aber von dem *nas4-1* Allel ab und war in der *nas4x-1* Mutante am stärksten ausgeprägt. Während im vegetativen Entwicklungsstadium maximal junge Blätter eine offensichtliche Chlorose ausbildeten, war der *nas* Phänotyp bei Blättern des reproduktiven Entwicklungsstadiums deutlich stärker ausgeprägt (Abb. 4.7 / S. 78). Dies wies auf eine vermutlich wichtige Rolle des NA in der Blüten- und Samenentwicklung hin. Ein Modell, in dem die möglichen Funktionen des NA in der Fe- und Metallhomöostase abgebildet sind, ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Im folgenden werden die Auswirkungen des NA Mangels auf die Physiologie der *nas4x-1* Mutante näher beleuchtet und in den Kontext der Metallhomöostase eingeordnet.

5.3.1 NA wirkt hauptsächlich in der Fe Homöostase

Das hervorstechende physiologische Merkmal der *nas4x-1* Mutante war die konstitutiv auf hohem Niveau aktive Fe Mangelantwort, die sich sowohl auf Ebene der Genexpression von Fe Mangel Markergenen als auch enzymatisch durch die Messungen der Fe Chelat Reduktase Aktivität äußerte (Abb. 4.17 / S. 92, Abb. 4.15 / S. 89). Trotz des scheinbaren Fe Mangels wurden jedoch mehr als ausreichende Mengen Fe mobilisiert, in die Pflanze aufgenommen und verteilt. Die v. a. in Blättern des reproduktiven Entwicklungsstadiums um das 3fache erhöhte Akkumulation des Fe deutete zudem darauf hin, dass der Fe Transport im Xylem durch den NA Mangel in der *nas4x-1* Mutante nicht gestört war (Abb. 4.9 / S. 80). Diese Beobachtungen stehen absolut in Einklang mit den Beobachtungen an der NA freien Tomatenmutante *chloronerva* [Scholz et al. (1992)] und bestätigen somit diese als typische auf NA Mangel zurückzuführende physiologische Änderungen in dicotylen Pflanzen. Interessanterweise unterscheiden sich *chloronerva* und *nas4x-1* in diesem Punkt deutlich von der dritten bislang bekannten, in ihrem NA Gehalt reduzierten Pflanze, dem mit *PCaMV-35S::NAAT* transformierten Tabak [Takahashi et al. (2003)]. In chlorotischen Blättern dieser NA freien Tabakpflanzen kam es zu einer generellen Abnahme der Metallgehalte, insbesondere auch Fe. Wie bereits in der Einleitung angedeutet, kann dieses Ergebnis auf die Metabolisierung des NA zu DMA zurück geführt werden. DMA ist ebenfalls ein Chelator divalenter Schwermetallionen. Eine Beeinflussung der Metallhomöostase des transgenen Tabak durch DMA ist daher als sehr wahrscheinlich einzustufen und stellt zumindest teilweise die biologische Relevanz der durch Takahashi et al. (2003) mit Hilfe des transgenen Tabaks gewonnenen Erkenntnisse in Frage.

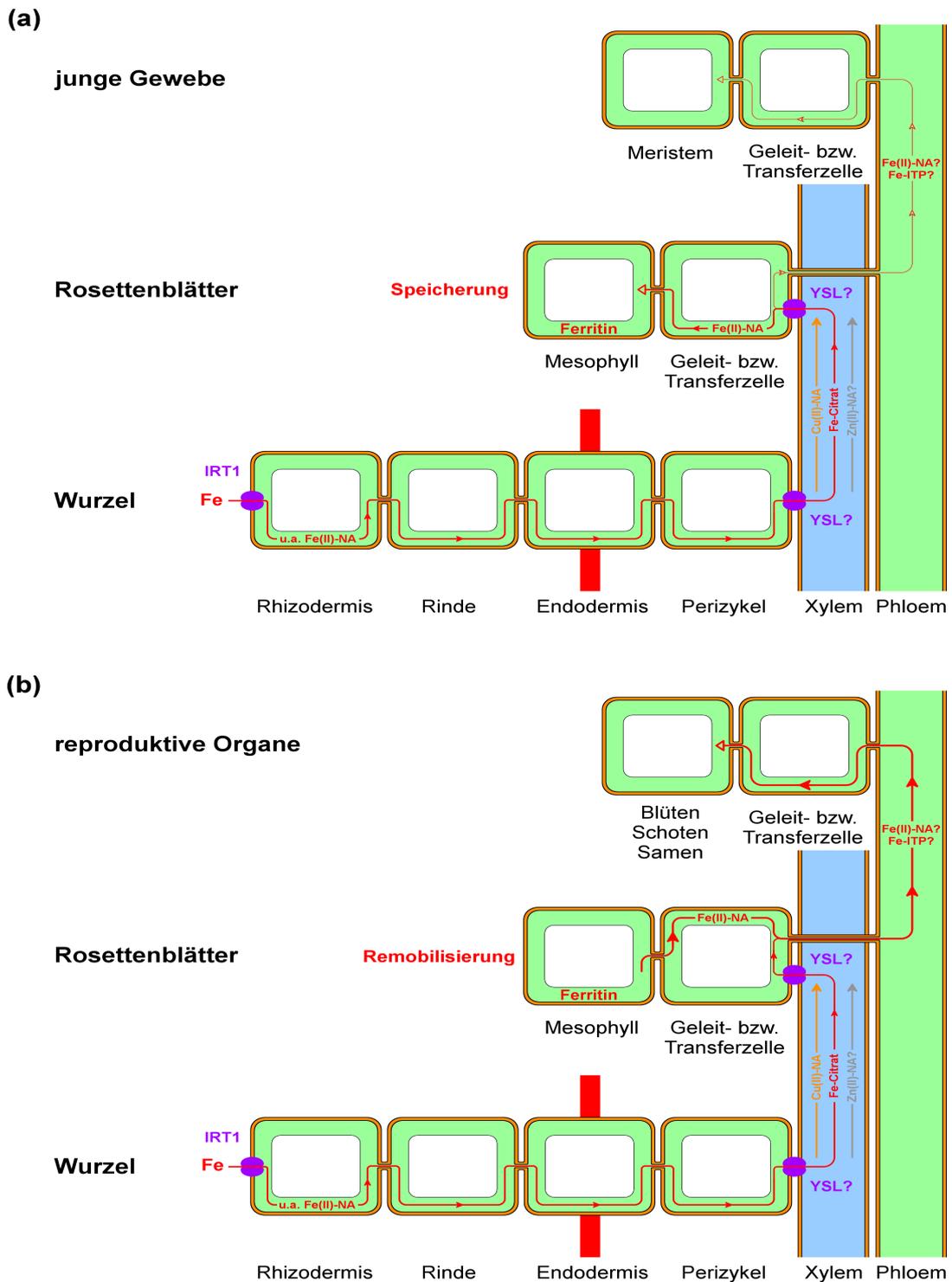


Abbildung 5.2: Hypothetisches Modell über die Rolle des NA in der Fe und Metallhomöostase. **(a)** In der vegetativen Entwicklungsphase wird aufgenommenes Fe sowohl in sich entwickelnde, junge Gewebe als auch in vegetative Blätter zwecks Speicherung in Form von Phytoferritin transportiert. Während NA für den radialen Transport des Fe in den Wurzeln nicht essentiell zu sein scheint, deutet der Vergleich zwischen *nas4x-1* und *chloronerva* auf eine essentielle Funktion des NA in der korrekten Speicherung des Fe in remobilisierbarer Form hin. **(b)** In der reproduktiven Entwicklungsphase wird Fe vornehmlich in die sich entwickelnden reproduktiven Organe transportiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Remobilisierung und Translokation des in den Blättern gespeicherten Fe möglicherweise direkt von NA abhängt. Grafische Darstellung modifiziert nach [Kim und Guerinot (2007)].

5.3.1.1 Fe akkumulierte in Blättern der *nas4x-1* Mutante in remobilisierbarer Form

Das in Blättern der NA freien Tomatenmutante *chloronerva* akkumulierte Fe präzipitierte in unlöslicher Form als Fe-Phosphat in Chloroplasten des Palisadenparenchyms [Becker et al. (1992)]. Wie die in dieser Arbeit beschriebene Untersuchung der Metallgehalte nach 5 Tagen Fe Mangel jedoch zeigte, lag das in Blättern der *nas4x-1* Mutante akkumulierte Fe offensichtlich in remobilisierbarer und damit löslicher Form vor (Abb. 4.16b / S. 90). Dieser Unterschied ist ein Hinweis auf eine mögliche Funktion des NA in der Speicherung von Fe in löslicher Form, beispielsweise in der Beladung eines Speicherstoffs wie Phytoferritin. Dies ist insbesondere deshalb interessant, da in Blättern von *chloronerva* trotz Fe Akkumulation kein Phytoferritin nachgewiesen werden konnte [Becker et al. (1995)]. Im Gegensatz dazu waren in ersten GenChip Experimenten in Blattproben der *nas4x-1* Mutante die Ferritin Gene *FER1* und *FER4* unter Kontrollbedingungen induziert, was auf eine Akkumulation von Phytoferritin hindeutet [Diplomarbeit M. Schuler, nicht publiziert].

Die Remobilisierung des akkumulierten Fe in Blättern der *nas4x-1* Mutante unter Fe Mangel ging mit einer im Vergleich zu Wild Typ deutlich abgeschwächten Abnahme des Fe Gehalts in den Wurzeln einher (Abb. 4.16a / S. 90). Das in den Blättern remobilisierte Fe wurde daher vermutlich primär in die Wurzeln verlagert. Angesichts der kurzen Dauer des Experiments (5 Tage Fe Mangel) fiel auf, dass die Remobilisierung und in Richtung Wurzel gerichtete Translokation des Fe durch den NA Mangel nicht eingeschränkt zu sein schien. Im Gegensatz dazu konnte der Fe Mangel in den reproduktiven Organen und in Samen jedoch nicht komplett abgepuffert werden (Abb. 4.9d / S. 80). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin bestehen, dass NA zumindest zu einem großen Teil zusammen mit Fe und Zn in die Samenanlagen eingelagert wird und somit eine effektive Zirkulation von NA zurück zu den Blättern nicht mehr gewährleistet ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ausschliesslich für die Translokation in die Wurzeln ein alternativer Transportweg des Fe im Phloem, beispielsweise über das ITP Protein [Krüger et al. (2002)], besteht.

5.3.1.2 NA ist essentiell in der reproduktiven Entwicklung

Der *nas* Phänotyp war bei einsetzender reproduktiver Entwicklungsphase deutlich verstärkt (Abb. 4.7 / S. 78, Abb. 4.10 / S. 82). Gleichzeitig war in diesem Stadium kein NA in den Blättern detektierbar, während NA in Blüten, Schoten und Samen im Vergleich zu Wild Typ in Mengen bis zu 40% akkumulierte. In ähnlichem Maße waren in den reproduktiven Organen auch die Gehalte an Fe und Zn reduziert, so dass von einem direkten Zusammenhang zwischen der Metallversorgung und dem NA Gehalt ausgegangen werden konnte (Abb. 4.8 / S. 79, Abb. 4.9d / S. 80).

Auch die Ergebnisse der Genexpressionsstudien deuten auf eine direkte Beteiligung von NA an der Metallversorgung der reproduktiven Organe hin. In Blüten und Schoten der *nas4x-1* Mutante waren die Gene *YSL1* und *YSL2* im Vergleich zu Wild Typ differentiell

reguliert. Während *YSL1* deutlich induziert war, war *YSL2* nahezu vollständig reprimiert (Abb. 4.18c / S. 94). *YSL1* wurde bereits in vorangehenden Studien direkt mit der Beladung von Samen mit NA-Fe Chelat in Verbindung gebracht [Le Jean et al. (2005)]. Diese Hypothese wurde insbesondere durch die Lokalisierung von P^{YSL1} -GUS in der für die Versorgung des reifenden Samens wichtigen Chalaza gestützt. Auch enthielten Samen der *ysl1* Mutante deutlich geringere Konzentrationen an Fe und NA [Le Jean et al. (2005)]. Zu *YSL2* existieren keine detaillierten Lokalisierungsstudien in reproduktiven Organen. Allerdings kann aufgrund des Expressionsmusters davon ausgegangen werden, dass *YSL2* im Gegensatz zu *YSL1* nicht direkt in die Metallversorgung der Samenanlagen involviert ist, sondern z. B. den NA-Fe Transport in für die Reproduktion weniger wichtige Gewebe der reproduktiven Organe vermittelt. Da durch den niedrigen Fe Gehalt und die deutliche Induktion von *IRT1* in Blüten und Schoten ein Fe Mangel in diesen Organen vorlag, folgt das Expressionsmuster von *YSL2* somit dem Expressionsmuster in Wurzeln und Blättern, wo *YSL2* unter Fe Mangel ebenfalls reprimiert war (Abb. 4.18 / S. 94, [DiDonato et al. (2004), Schaaf et al. (2005)]).

Die starke Induktion von *IRT1* in den reproduktiven Organen der *nas4x-1* Mutante stellt einen neuen Aspekt der biologischen Funktionen von *IRT1* dar (Abb. 4.17c / S. 92), wobei aus $P^{IRT1}::GUS$ Studien bislang nur das Filament der Antheren als mögliche Lokalisation der *IRT1* Transkription bekannt ist [Vert et al. (2002)]. *IRT1* vermittelt in Wurzeln den Transport von Fe aus den Apoplasten in den Symplasten. Die starke Induktion von *IRT1* unter NA Mangel könnte daher ein Indiz dafür sein, dass bei mangelnder, vermutlich NA abhängiger Fe Versorgung über das Phloem, ein alternativer Fe Transport über das Xylem induziert wird, für dessen Entladung *IRT1* verantwortlich sein könnte.

5.3.2 Einordnung der *NAS* Gene in das regulatorische Netzwerk der Fe Homöostase

NA Mangel bewirkte die konstitutive Induktion der Fe Mangelantwort inklusive der für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene *FIT* und *BHLH100* (Abb. 4.17 / S. 92). Im Gegensatz dazu war die *fit-3* Mutante mit defektem *FIT* Gen nicht in der Lage, die Markergene für Fe Mangel zu induzieren. Die Kreuzung der *nas4x-1* Mutante mit *fit-3* resultierte in der *nas4x-1fit-3* Fünffachmutante, die sowohl in ihrem Phänotyp als auch in ihrer Physiologie nicht der *nas4x-1* Mutante, sondern der *fit-3* Mutante ähnelte (Abb. 4.19 / S. 95). Daraus folgte die Schlussfolgerung, dass *FIT* epistatisch auf die *NAS* Gene wirkte (Diplomarbeit M. Schuler, nicht publiziert).

In Expressionsstudien an der *fit-3* Mutante und einer *FIT* überexprimierenden Linie ergab sich eine direkte Abhängigkeit von *NAS1* und *NAS4* von *FIT*, während die Expression von *NAS2* und *NAS3* durch die Verfügbarkeit von *FIT* nicht beeinflusst war. Interessanterweise entsprach das Expressionsmuster von *NAS1* in diesem Experiment dem der Fe Mangel Markergene *IRT1* und *FRO2*, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die *NAS1* Expression ebenso wie *IRT1* und *FRO2* direkt durch *FIT* reguliert war (Abb.

4.20 / S. 97). Wie bereits bemerkt, war *NAS1* jedoch nur im Agarplattensystem, nicht aber im hydroponischen System unter Fe Mangel induzierbar. Daher ergibt sich die Frage, inwiefern *NAS1* von *FIT* abhängig ist, wenn die *fit-3* Mutante und die $P^{2xCaMV-35S}::FIT$ Linie im hydroponischen System angezogen werden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Regulation von *NAS1* bietet die in dem im Agarplattensystem enthaltene Saccharose. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Glucose, ein direktes Hydrolyseprodukt der Saccharose, neben der ernährenden Funktion auch an einer multiplen Signaltransduktion beteiligt ist. So wirkt Glucose z. B. inhibierend auf die Synthese der Pflanzenhormone Ethylen und ABA [Übersicht in León und Sheen (2003)] und wirkt damit auf das gesamte Transkriptom von *A. thaliana* [Price et al. (2004)].

Im Rahmen der Diplomarbeit von Fr. Julia Fleischer-Dietrich konnte eine *in vitro* Proteininteraktion der beiden Transkriptionsfaktoren FIT und EIL1 beobachtet werden [Fleischer (2007)]. EIL1 (EIN3-Like1) ist ein Transkriptionsfaktor, der gemeinsam mit EIN3 (Ethylene insensitive3) eine Schlüsselrolle in der Ethylenantwort spielt [Chao et al. (1997)]. Sowohl die Transkription als auch die Proteininstabilität von *EIL1/EIL1* werden durch Glucose inhibiert [Yanagisawa et al. (2003), Price et al. (2004)]. Es ist daher denkbar, dass die Interaktion zwischen FIT und EIL1 einen regulatorisch negativen Einfluss auf die *NAS1* Transkription hat, der aufgrund des Zuckergehalts im Agarplattensystem durch reduziertes oder fehlendes EIL1 aufgehoben wird. Darüber hinaus könnte die Expression mindestens von *NAS3* auch direkt durch Ethylen reguliert sein, wie die Isolierung eines Ethylen-responsiven Elements im Promotor von *NAS3* nahe legt [Suzuki et al. (2001)].

5.3.3 Änderungen in der Verteilung von Metallen unter NA Mangel - die Rolle von NA in Transport und Verteilung weiterer Metalle

In Blättern der *nas4x-1* Mutante akkumulierte Fe, während die Gehalte an Cu und Zn im Vergleich zu Wild Typ geringer waren. Gleichzeitig waren die Cu und Zn Gehalte in Wurzeln entweder leicht erhöht (Cu) oder im Vergleich zu Wild Typ unverändert (Zn) (Abb. 4.9 / S. 80). Eine direkte Beteiligung von NA in der Translokation der Metalle aus den Wurzeln in den Sproß war demnach nur für Cu und Zn anzunehmen. Interessanterweise wurde auch in der Tomatenmutante *chloronerva* NA als Translokator von Cu im Xylem postuliert [Pich und Scholz (1996)]. Im Gegensatz zur *nas4x-1* Mutante waren die Zn Gehalte in *chloronerva* im Vergleich zu Wild Typ jedoch unverändert, so dass eine direkte oder indirekte Rolle von NA im Zn Transport in *Arabidopsis* einen neuen Aspekt darstellt, der auch durch den Zn Mangel in den reproduktiven Organen und Samen gestützt wird. Zur Klärung dieses Aspekts sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

5.4 Nicotianamin vermittelt Toleranz gegenüber Nickel, aber nicht gegenüber Zink

Der NA Gehalt von Pflanzen wurde in bisherigen Studien an Schwermetall Hyperakkumulatoren und transgenen Pflanzen mit der Toleranz gegenüber Schwermetallen, insbesondere Zn und Ni, in Verbindung gebracht (vgl. Abschnitt 1.3.6). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien zeigten in der Tat, dass sämtliche *NAS* Gene durch Überschuss von Cu, Mn, Zn und Ni reguliert waren (Abb. 4.3 / S. 71). Mit Ausnahme von Ni folgte das Muster der *NAS* Genregulation unter Metall Stress jedoch der bei Fe Mangel beobachteten *NAS* Genregulation (*NAS1*, *NAS2* und *NAS4* induziert, *NAS3* reprimiert). Auch waren unter sämtlichen Metall Stress Bedingungen die Markergene für Fe Mangel, *IRT1* und *FRO2*, induziert. In der Tat bieten die Konkurrenz von Mn, Zn und Fe um den Metalltransporter IRT1, sowie inhibierende Effekte auf IRT1 durch Cu und Cd [Korshunova et al. (1999)], geeignete Erklärungen für einen sekundär durch Metall Stress ausgelösten Fe Mangel. Aber auch die direkte Konkurrenz der Metalle um NA könnte indirekt einen Einfluss auf die Fe Homöostase haben.

Eine eindeutige Korrelation der Schwermetalltoleranz mit dem NA Gehalt konnte in dieser Arbeit allerdings nur für Ni gezeigt werden. Linien der *nas* T-DNA Kollektion wiesen mit zunehmender Zahl an *nas* Mutationen und damit wahrscheinlich geringerem NA Gehalt eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ni Stress auf. Dem gegenüber konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber Fe und Cu Überschuss beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Sensitivität der *nas* T-DNA Kollektion gegenüber Zn war nur leicht erhöht. Der damit verbundene Phänotyp, eine gleichmäßig hellere Färbung der jüngeren Blätter, wies in Art und Stärke der Ausprägung allerdings weniger auf eine Verknappung des NA hin. Vielmehr wurde die im Vergleich zu Wild Typ leichte Verstärkung des Zn Stress Phänotyps auf die erhöhte Sensitivität der *nas* T-DNA Mutanten gegenüber Fe Mangel zurück geführt, die sich ebenfalls in einer helleren Blattfärbung äußerte.

Diese Interpretation steht auch in Einklang mit jüngeren Studien zur Zn Toleranz des natürlichen Zn,Cd Hyperakkumulators *A. halleri*. Trotz einer in Wurzeln im Vergleich zu *A. thaliana* um das 73fache induzierten *NAS2* Expression [Weber et al. (2004)], wurden basierend auf Gen Kartierungsstudien andere Komponenten der Metallhomöostase (*AhHMA4*, *AhMTP1-A* & *AhMTP1-B*) als Faktoren für die hohe Zn Toleranz favorisiert [Dräger et al. (2004), Filatov et al. (2007), Willems et al. (2007)]. Da *A. halleri* neben der Toleranz gegenüber Zn auch tolerant gegenüber dem Schwermetall Cd ist, ist eine Rolle des NA in der Toleranz gegenüber Cd sehr wahrscheinlich.

Auch jüngste Studien an dem Zn,Ni Hyperakkumulator *Thlaspi caerulescens* ergaben keinen Zusammenhang zwischen der Zn Toleranz und NA [Callahan et al. (2007)]. Stattdessen wurde in Blättern dieser Pflanzen eine deutliche Korrelation zwischen NA und Ni Gehalt beobachtet, was eine Rolle von NA in der Toleranz gegenüber Ni bestätigt. Interessanterweise berichteten die Autoren auch, dass der Gehalt zwischen Fe und Ni

in Blättern invers korreliert war. Eine Konkurrenz der beiden Metalle um NA wird damit wahrscheinlich, wodurch auch die Induktion der Fe Mangelantwort Markergene unter Ni Stress eine Erklärung findet. Gleichzeitig bestätigt dieses Ergebnis aber auch die in dieser Arbeit deutlich gemachte Wichtigkeit von NA in der Fe Homöostase.

Die Analyse der *nas* T-DNA Kollektion unter Ni Stress eignete sich durch eine gute Abstufung der Ausprägung des durch Ni verursachten Phänotyps auch für eine hierarchische Einordnung der einzelnen *NAS* Gene in den Kontext der Ni Toleranz. So zeigten Mutanten mit der *nas4-1* Mutation gefolgt von *nas3-1* die größte Sensitivität, während die *nas1-1* Mutation keine, und die *nas2-1* Mutation, möglicherweise bedingt durch die Insertion im 5'-UTR, sogar eine die Ni Sensitivität z. T. abschwächende Wirkung hatten (Abb. 4.13 / S. 87). Interessanterweise konnte diese Hierarchie auf Ebene der Genexpression jedoch nicht bestätigt werden. Die Betrachtung der absoluten Transkriptmengen ergab vielmehr, dass *NAS4* sowohl in Wurzeln als auch in Blättern des Wild Typ unter Ni Stress nicht das dominierende *NAS* Gen war (Abb. 4.14 / S. 88). Diese Diskrepanz könnte damit ein Hinweis auf eine post-transkriptionelle Regulation oder aber eine unterschiedliche Lokalisierung der *NAS* Aktivität innerhalb der Wurzeln und Blätter von *A. thaliana* sein.

6 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die *NAS* Genfamilie und die Funktion von Nicotianamin umfassend in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* analysiert. Auf dieser Arbeit aufbauende, weiterführende Studien werden in Zukunft einen wichtigen Beitrag zu einem umfassenden Verständnis der Metallhomöostase leisten. Wie unter Abschnitt 1.4.3 (ab S. 36) bereits erläutert, ist ein solches Verständnis zwingend notwendig, um über transgene Ansätze eine zielgerichtete Optimierung von Kulturpflanzen vorzunehmen. Mit der Optimierung der Metallaufnahme könnte eine Ausweitung der Anbauggebiete wichtiger Kulturpflanzen und damit eine wichtige quantitative Ertragssteigerung möglich sein. Darüber hinaus spielt auch die qualitative Optimierung durch Anpassung der Mineralstoffgehalte von Samen und Früchten an die menschlichen Ernährungsbedürfnisse eine sehr wichtige Rolle in zukünftigen Ernährungsprogrammen. Die dadurch erhoffte Eindämmung von Mangelerkrankungen bietet eine große Chance, gerade in Entwicklungsländern durch eine Verbesserung der Gesundheit der Bevölkerung eine signifikante Erhöhung der wirtschaftlichen Leistungsfähigkeit bei gleichzeitiger Entlastung der Gesundheitssysteme zu erreichen.

Ein wesentlicher Meilenstein dieser Arbeit war die Generierung der *nas* T-DNA Kollektion, insbesondere der *nas4x-1* und *nas4x-2* Mutanten. Neben dem biologischen Material wurde von der Pflanzenanzucht über die Genexpression mittels real-time qPCR zur NA Analyse mittels HPLC ein robustes Methodenspektrum geschaffen, mit dem ein Großteil der in Zukunft zu erwartenden biologischen Fragestellungen an den *nas* Mutanten routinemäßig beantwortet werden kann. Die Analyse der *nas4x-1* Mutante ergab, dass diese Mutante im Gegensatz zur Tomatenmutante *chloronerva* nicht vollends frei von NA war. Die Konsequenzen dieses Unterschiedes liegen im wesentlichen darin, dass die *nas4x-1* Mutante nicht steril ist und somit ihren Lebenszyklus vollenden kann. Auf Ebene der Physiologie verhält sich die *nas4x-1* Mutante jedoch im wesentlichen wie *chloronerva*. So ist die Fe Mangelantwort konstitutiv aktiv, Fe akkumuliert in den Blättern, während es an Cu in den Blättern leicht mangelt und dieses in den Wurzeln leicht akkumuliert.

Nichts desto trotz wurden auch Unterschiede zwischen *chloronerva* und der *nas4x-1* Mutante beobachtet. So ergaben sich Hinweise, dass akkumuliertes Fe in Blättern der *nas4x-1* Mutante in remobilisierbarer Form gespeichert wird. Da in Blättern von *chloronerva* trotz Fe Akkumulation die typische Speicherform des Fe, Phytoferritin, nicht gebildet wurde, könnte in zukünftigen Studien eine mögliche Verbindung zwischen NA

und Phytoferritin hergestellt werden. Zur Bestätigung der Hypothese einer Interaktion ist es dabei zunächst von Interesse festzustellen, inwiefern sich die *nas4x-1* Mutante und die wahrscheinlich NA freie *nas4x-2* Mutante in ihrem Gehalt an Phytoferritin unterscheiden. Auf der Basis der Hypothese, dass NA zur Beladung des Phytoferritins benötigt wird, wäre dabei ein Fehlen des Ferritins in der *nas4x-2* Mutante zu erwarten.

Ein weiterer Unterschied zwischen *chloronerva* und *nas4x-1* Mutante lag in der Zn Homöostase. Mit Ausnahme der Wurzel waren die Zn Gehalte in sämtlichen Teilen der *nas4x-1* Mutante reduziert, während NA Mangel in *chloronerva* keine Auswirkungen auf die Zn Homöostase hatte. Da Zn jedoch nicht in Wurzeln der *nas4x-1* Mutante akkumulierte, wird eine leichte Einschränkung der Zn Aufnahme unter NA Mangel favorisiert. In den durch M. Schuler durchgeführten Microarray Experimenten zeigte sich lediglich das *IRT2* Gen durch den NA Mangel in Wurzeln der *nas4x-1* Mutante um das 2,77fache induziert. Weitere Mitglieder der potentiell Zn transportierende *ZIP* Genfamilie, auch das *IRT1* Gen, waren in diesen Experimenten jedoch nicht durch NA Mangel reguliert, geschweige denn reprimiert [Diplomarbeit M. Schuler]. Dass in dem GenChip Experiment die in der real-time qPCR detektierte Induktion von *IRT1* in der *nas4x-1* Mutante nicht detektiert wurde, ist allerdings ein Zeichen, dass in dieser Methode durchaus auch interessante Effekte übersehen werden könnten. Eine Überprüfung der *ZIP* Genfamilie mittels der sensitiveren und exakteren real-time qPCR wäre daher empfehlenswert, um auch geringere Unterschiede in der Expression festzustellen und mögliche, durch Fe Mangel reprimierte *ZIP* Transporter zu identifizieren.

Der interessanteste Aspekt der *nas4x-1* Mutante stellt die Möglichkeit dar, effektiv die Auswirkungen von NA Mangel dort zu untersuchen, wo es in *chloronerva* nicht möglich ist: in den reproduktiven Organen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse betonen dabei die Wichtigkeit von NA in der reproduktiven Entwicklung, die wahrscheinlich in einer Funktion in der Beladung der Samenanlagen mit Fe besteht. Es häufen sich auch die Hinweise, dass tatsächlich *YSL1* für die Beladung der Samenanlagen mit NA-Fe Chelat verantwortlich ist. Damit ist mit *YSL1* bereits ein Kandidat identifiziert, der in einem zukünftigen multi-transgenen Ansatz den gezielten Fe Transport in die Samenanlagen eine Rolle spielen könnte. Allerdings ist insbesondere eine genaueres Verständnis über die Regulation des *YSL1* Promotors notwendig, um eine erhöhte Expression ausschliesslich in der Chalaza zu bewirken. Gleichzeitig ist jedoch eine Repression nicht nur von *YSL1*, sondern auch von *YSL2* und *YSL3* in den Blättern notwendig, um eine mit der Fe Einlagerung in Samen konkurrierende Speicherung von Fe in Blättern zu unterbinden. In diesem Zusammenhang ist auch eine Ausweitung der Transkriptionsstudien auf die gesamte *YSL* Genfamilie notwendig, um weitere potentielle Transporter von NA-Metall Chelat zu identifizieren und deren Regulation in dem angestrebten multi-transgenen Ansatz zu berücksichtigen. Die bisher durchgeführten Microarray Experimente auf Wurzel- und Blattproben ergaben bislang nur wenige Hinweise auf eine NA abhängige Regulation von *YSL* Genen. Allerdings wurden in diesen Experimenten auch die Effekte auf *YSL1*, *YSL2* und *YSL3* in Blättern nicht detektiert. So ist durchaus denkbar, dass mit Hilfe

der real-time qPCR weitere auf NA Mangel reagierende *YSL* Gene identifiziert werden könnten. Trotz der offensichtlich geringen Sensitivität der Affymetrix GenChip Technologie wäre es in zukünftigen Experimenten dennoch sinnvoll, auch die Transkriptome von Blüten und Schoten mit dieser globalen Methode zu untersuchen. Schliesslich waren die Microarray Experimente bislang auf Wurzeln und Blätter der *nas4x-1* Mutante beschränkt, so dass spezifisch in den reproduktiven Geweben von NA abhängige Gene bislang nicht identifiziert werden konnten.

Einen weiteren wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation des Netzwerks der Metallhomöostase stellt die Verwendung von Promotor::Reportergen Konstrukten (GUS/GFP) dar. Beispielsweise wäre es damit möglich, die gegenläufige Regulation von *NAS3* und *NAS4* unter Fe Mangel durch eine unterschiedliche zelluläre oder subzelluläre Lokalisation der *NAS* Transkription in Blättern zu erklären. Eine Lokalisierung von *P^{NAS}::GUS* in den vaskulären Geweben der Blätter von *A. thaliana* wurde bereits 2004 auf dem XII. Internationalen Symposium zu Eisernährung und Interaktion in Pflanzen (Tokyo, Japan) in einem Posterbeitrag berichtet, jedoch bislang nicht publiziert.

Schlussendlich wurde ein möglicher Aspekt der Regulation des Transkriptionsfaktors FIT in Abhängigkeit von Saccharose bzw. Glucose entdeckt, der weitere Untersuchungen erfordert. Das *NAS1* Gen war im Agarplattensystem mit 1 % Saccharose in gleichem Maße abhängig von FIT wie *IRT1* und *FRO2* und darüber hinaus unter Fe Mangel induzierbar. Diese Induzierbarkeit unter Fe Mangel fehlte allerdings im Saccharose freien hydroponischen System. Daher ist es zum einen von Interesse, zunächst die *NAS1* Abhängigkeit von FIT anhand von Genexpressionsstudien in der *fit-3* Mutante und der *p2x35S::FIT* Überexpressionslinie im Agarose freien hydroponischen System zu überprüfen. Darüber hinaus wurde angenommen, dass die Interaktion der Transkriptionsfaktoren FIT und EIL1 für die Regulierbarkeit des *NAS1* Promotors durch FIT verantwortlich sein könnte, indem EIL1 in Anwesenheit von Zucker degradiert und FIT für die *NAS1* Transkription frei gibt. Zur Überprüfung dieser Vermutung könnte die Induzierbarkeit von *NAS1* in einer *eil1* knockout Mutante im hydroponischen System ohne Saccharose überprüft werden. Sollte *NAS1* in der *eil1* Mutante unter diesen Bedingungen bei Fe Mangel induzierbar sein, wäre dies der erste konkrete Schritt in die Integration von *NAS* Genen in bekannte Netzwerke der Genregulation.

Anhang

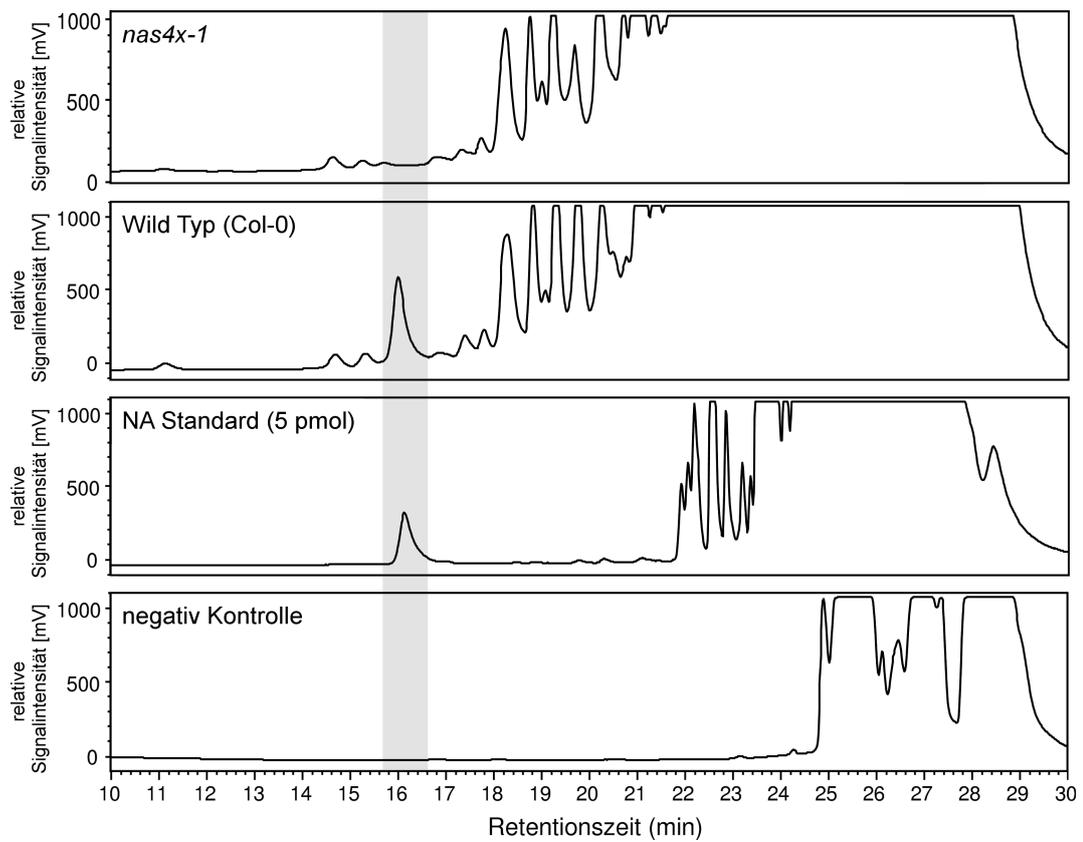


Abbildung A.1: Chromatogramm zur Analyse des NA Gehalts in Blättern des reproduktiven Entwicklungsstadiums der *nas4x-1* Mutante und Wild Typ (Col-0). Trotz der sehr hohen Sensitivität der Messmethode, die die Bestimmung von NA Mengen im femto-molaren Bereich ermöglichte, war in der *nas4x-1* Mutante kein NA nachweisbar.

Tabelle A.1: Auflistung sämtlicher in dieser Arbeit analysierten T-DNA und Transposon Insertionslinien.

Gen (AGI)	Kürzel	Bezeichnung (Ursprung)	Position	Bemerkungen
<i>NAS1</i> (At5g04950)	<i>nas1-1</i>	GABI-Kat 223A09 (GABI-Kat)	Exon, 69 bp nach ATG	≥ 2 Insertionen
	<i>nas1-2</i>	GABI-Kat 691D08 (GABI-Kat)	Exon, 209 bp nach ATG	
		SALK 082174 (SALK)	Exon, 5 bp nach ATG	
		SM_3_31695 (EXOTIC/JIC SM)	Exon, ~340 bp nach ATG	Transposon
		SM_3_31704 (EXOTIC/JIC SM)	Exon, ~340 bp nach ATG	Transposon
		SALK 098987 (SALK)	- negativ -	
<i>NAS2</i> (At5g56080)	<i>nas2-1</i>	SAIL 156C08 (Syngenta)	5'-UTR, 70 bp vor ATG	
	<i>nas2-2</i>	SALK 066962 (SALK)	Exon, 144 bp nach ATG	
	<i>nas2-3</i>	SALK 027438 (SALK)	5'-UTR, 13 bp vor ATG	
		SALK 122850 (SALK)	5'-UTR, 26 bp vor ATG	
		SALK 066930 (SALK)	- negativ -	
		SALK 066960 (SALK)	- negativ -	
	SALK 066963 (SALK)	- negativ -		
<i>NAS3</i> (At1g09240)	<i>nas3-1</i>	GABI-Kat 010A10 (GABI-Kat)	Exon, 69 bp nach ATG	Transposon
	<i>nas3-2</i>	461-464P17 (Wisconsin Ds-Lox)	5'-UTR, 135 bp vor ATG	
		SALK 106467 (SALK)	5'-UTR, 252 bp vor ATG	
		SALK 100644 (SALK)	- negativ -	
<i>NAS4</i> (At1g56430)	<i>nas4-1</i>	SALK 135507 (SALK)	Exon, 19 bp vor STOP	
	<i>nas4-2</i>	SALK 146697 (SALK)	5'-UTR, 250 bp vor ATG	
		SALK 017016 (SALK)	- negativ -	

Literaturverzeichnis

- Adams D.O. und Yang S.F.** (1979): Ethylene Biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid as an Intermediate in the Conversion of Methionine to Ethylene. In: *PNAS* 76(1): 170–174.
- Adler K. und Scholz G.** (1986): Die Chloroplastenstrukturen der Mutante *chloronerva* von *Lycopersicon esculentum* Mill. im Mutantenstatus und nach Normalisierung mit Nicotianamin. In: *Kulturpflanze* 34(2): 185–194.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C. und Ecker J.R.** (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. In: *Science* 301(5633): 653–657.
- Anderegg G. und Ripperger H.** (1989): Correlation between Metal Complex Formation and Biological Activity of Nicotianamine Analogues. In: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* : 647–650.
- Arabidopsis Genome Initiative** (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature* 408(6814): 796–815.
- Bagg A. und Neilands J.B.** (1987): Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. In: *Microbiological Reviews* 51(4): 509–518.
- Bashir K., Inoue H., Nagasaka S., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2006): Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. In: *Journal of Biological Chemistry* 281(43): 32 395–32 402.
- Bauer P., Thiel T., Klatte M., Berczky Z., Brumbarova T., Hell R. und Grosse I.** (2004b): Analysis of Sequence, Map Position, and Gene Expression Reveals Conserved Essential Genes for Iron Uptake in *Arabidopsis* and Tomato. In: *Plant Physiology* 136: 4169–4183.
- Beadle G.W.** (1929): Yellow Stripe-a Factor for Chlorophyll Deficiency in Maize Located in the Pr pr Chromosome. In: *The American Naturalist* 63(685): 189–192.
- Becher M., Talke I., Krall L. und Krämer U.** (2004): Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. In: *Plant Journal* 37(2): 251–268.
- Becker R., Fritz E. und Manteuffel R.** (1995): Subcellular Localization and Characterization of Excessive Iron in the Nicotianamine-less Tomato Mutant *chloronerva*. In: *Plant Physiology* 108(1): 269–275.

- Becker R., Grün M. und Scholz G.** (1992): Nicotianamine and the distribution of iron into the apoplasm and symplasm of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: *Planta* 187(1): 48–52.
- Bell W.D., Bogorad L. und McIlrath W.J.** (1958): Response of the Yellow-Stripe Maize Mutant *ys1* to Ferrous and Ferric Iron. In: *Botanical Gazette* 120(1): 36–39.
- Bell W.D., Bogorad L. und McIlrath W.J.** (1962): Yellow-Stripe Phenotype in Maize. I. Effects *ys1* Locus on Uptake and Utilization of Iron. In: *Botanical Gazette* 124(1): 1–8.
- Beneš I., Schreiber K., Ripperger H. und Kircheiss A.** (1983): Metal complex formation of nicotianamine, a possible phytosiderophore. In: *Experientia* 39: 261–262.
- Bereczky Z., Wang H.Y., Schubert V., Ganai M. und Bauer P.** (2003): Differential regulation of *nrap* and *irt* metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. In: *Journal of Biological Chemistry* 278(27): 24 697–24 704.
- Berg J.M. und Shi Y.** (1996): The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. In: *Science* 271(5252): 1081–1085.
- Bienfait H.F., Lubberding H.J., Heutink P., Lindner L., Visser J., Kaptein R. und Dijkstra K.** (1989): Rhizosphere Acidification by Iron Deficient Bean Plants: The Role of Trace Amounts of Divalent Metal Ions: A Study on Roots of Intact Plants with the Use of C- and P-NMR. In: *Plant Physiology* 90(1): 359–364.
- Bienfait H.F. und Scheffers M.R.** (1992): Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants. In: *Plant and Soil* 143(1): 141–144.
- Bonasera V., Alberti S. und Sacchetti A.** (2007): Protocol for high-sensitivity/long linear-range spectrofluorimetric DNA quantification using ethidium bromide. In: *BioTechniques* 43(2): 173–176.
- Briat J.F., Lobréaux S., Grignon N. und Vansuyt G.** (1999): Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 56(1-2): 155–166.
- Brown J., Chaney R.L. und Amber J.** (1971): A new tomato mutant inefficient in the transport of iron. In: *Physiologia Plantarum* 25: 45–53.
- Brumbarova T. und Bauer P.** (2005): Iron-mediated control of the basic helix-loop-helix protein FER, a regulator of iron uptake in tomato. In: *Plant Physiology* 137(3): 1018–1026.
- Buděšínský M., Budzikiewicz H., Procházka Z., Ripperger H., Römer A., Scholz G. und Schreiber K.** (1980): Nicotianamine, a possible phytosiderophore of general occurrence. In: *Phytochemistry* 11: 2295–2297.
- Bughio N., Yamaguchi H., Nishizawa N.K., Nakanishi H. und Mori S.** (2002): Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. In: *Journal of Experimental Botany* 53(374): 1677–1682.
- Böhme H. und Scholz G.** (1960): Versuche zur Normalisierung des Phänotyps der Mutante *chloronerva* von *Lycopersicon esculentum*. In: *Kulturpflanze* 8(1): 93–109.
- Cakmak I., Marschner H. und Bangerth F.** (1989): Effect of Zinc Nutritional Status on Growth, Protein Metabolism and Levels of Indole-3-acetic Acid and other Phytohormones in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *Journal of Experimental Botany* 40(3): 405–412.
- Callahan D.L., Kolev S.D., O'Hair R.A.J., Salt D.E. und Baker A.J.M.** (2007): Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. In: *New Phytologist* 176(4): 836–848.

- Chao Q., Rothenberg M., Solano R., Roman G., Terzaghi W. und Ecker J.R.** (1997): Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. In: *Cell* 89(7): 1133–1144.
- Church G.M. und Gilbert W.** (1984): Genomic sequencing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(7): 1991–1995.
- Clemens S.** (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. In: *Planta* 212(4): 475–486.
- Clough S.J. und Bent A.F.** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Journal* 16(6): 735–743.
- Cohen C.K., Garvin D.F. und Kochian L.V.** (2004): Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. In: *Planta* 218(5): 784–792.
- Colangelo E.P. und Guerinot M.L.** (2004): The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. In: *Plant Cell* 16(12): 3400–3412.
- Colangelo E.P. und Guerinot M.L.** (2006): Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. In: *Current Opinion in Plant Biology* 9(3): 322–330.
- Connolly E., Campbell N., Grotz N., Prichard C. und Guerinot M.** (2003): Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. In: *Plant Physiology* 133(3): 1102–1110.
- Connolly E., Fett J. und Guerinot M.** (2002): Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. In: *Plant Cell* 14(6): 1347–1347.
- Curie C., Alonso J.M., Jean M.L., Ecker J.R. und Briat J.F.** (2000): Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. In: *Biochemical Journal* 347 Pt 3: 749–755.
- Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S., Briat J. und Walker E.** (2001): Maize *yellow stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. In: *Nature* 409(6818): 346–349.
- Delhaize E. und Ryan P.R.** (1995): Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. In: *Plant Physiology* 107(2): 315–321.
- Desbrosses-Fonrouge A.G., Voigt K., Schröder A., Arrivault S., Thomine S. und Krämer U.** (2005): *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. In: *FEBS Letters* 579(19): 4165–4174.
- Deák M., Horváth G.V., Davletova S., Török K., Sass L., Vass I., Barna B., Király Z. und Dudits D.** (1999): Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. In: *Nature Biotechnology* 17(2): 192–196.
- DiDonato Jr J., Roberts L., Sanderson T., Easley R. und Walker E.** (2004): *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. In: *Plant Journal* 39(3): 403–414.
- Douchkov D.** (2003): *Nicotianamine synthase: Gene isolation, gene transfer and application for the manipulation of metal assimilation*. Dissertation, IPK Gatersleben und Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Douchkov D., Gryczka C., Stephan U.W., Hell R. und Bäumlein H.** (2005): Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. In: *Plant, Cell and Environment* 28: 365–374.
- Douchkov D., Hell R., Stephan U.W. und Bäumlein H.** (2001): Increased iron efficiency in transgenic plants due to ectopic expression of nicotianamine synthase. In: *Plant Nutrition* 92: 54–55.
- Dräger D.B., Desbrosses-Fonrouge A.G., Krach C., Chardonnens A.N., Meyer R.C., Saumitou-Laprade P. und Krämer U.** (2004): Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. In: *Plant Journal* 39(3): 425–439.
- Durrett T.P., Gassmann W. und Rogers E.E.** (2007): The FRD3-mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation. In: *Plant Physiology* .
- Eide D., Broderius M., Fett J. und Guerinot M.L.** (1996): A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(11): 5624–5628.
- Einarsson S., Josefsson B. und Lagerkvist S.** (1983): Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 30: 609–618.
- Fenton H.** (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron. In: *Journal of the Chemical Society, Transactions* 65: 899–910.
- Filatov V., Dowdle J., Smirnov N., Ford-Lloyd B., Newbury H.J. und Macnair M.R.** (2007): A quantitative trait loci analysis of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. In: *New Phytologist* 174(3): 580–590.
- Fleischer J.** (2007): *Proteininteraktionsstudien von FIT, einem essentiellen Transkriptionsfaktor für Eisenaufnahme und -Mobilisierung in Arabidopsis thaliana.* Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Fox T.C. und Guerinot M.L.** (1998): Molecular Biology of Cation Transport In Plants. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 669–696.
- Gendre D., Czernic P., Conéjéro G., Pianelli K., Briat J.F., Lebrun M. und Mari S.** (2007): TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. In: *Plant Journal* 49(1): 1–15.
- Gitan R.S. und Eide D.J.** (2000): Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. In: *Biochemical Journal* 346 Pt 2: 329–336.
- Gitan R.S., Luo H., Rodgers J., Broderius M. und Eide D.** (1998): Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. In: *Journal of Biological Chemistry* 273(44): 28 617–28 624.
- Green L. und Rogers E.** (2004): FRD3 Controls Iron Localization in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 136: 2523–2531.
- Grusak M. und Pezeshgi S.** (1996): Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the *dgl* Mutant of Pea. In: *Plant Physiology* 110(1): 329–334.
- Grusak M.A.** (1994): Iron Transport to Developing Ovules of *Pisum sativum* (I. Seed Import Characteristics and Phloem Iron-Loading Capacity of Source Regions). In: *Plant Physiology* 104(2): 649–655.

- Grusak M.A. und DellaPenna D.** (1999): Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 133–161.
- Guerinot M.** (2001): Improving rice yields—ironing out the details. In: *Nature Biotechnology* 19(5): 417–418.
- Gustavsson B. und Betnér I.** (1990): Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenyl methylchloroformate and 1-aminoadamantane. In: *Journal of Chromatography A* 507: 67–77.
- Hamer D.H.** (1986): Metallothionein. In: *Annual Review of Biochemistry* 55: 913–951.
- Harada E., Sugase K., Namba K., Iwashita T. und Murata Y.** (2007): Structural element responsible for the Fe(III)-phytosiderophore specific transport by HvYS1 transporter in barley. In: *FEBS Letters* 581(22): 4298–4302.
- Haydon M.J. und Cobbett C.S.** (2007): Transporters of ligands for essential metal ions in plants. In: *New Phytologist* 174(3): 499–506.
- Hell R. und Stephan U.W.** (2003): Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. In: *Planta* 216(4): 541–551.
- Henriques R., Jasik J., Klein M., Martinoia E., Feller U., Schell J., Pais M. und Koncz C.** (2002): Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. In: *Plant Molecular Biology* 50(4-5): 587–597.
- Herbik A., Giritch A., Horstmann C., Becker R., Balzer H.J., Bäumlein H. und Stephan U.W.** (1996): Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant *chloronerva*. In: *Plant Physiology* 111(2): 533–540.
- Herbik A., Koch G., Mock H.P., Douchkov D., Czihal A., Thielmann J., Stephan U.W. und Bäumlein H.** (1999): Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants. In: *European Journal of Biochemistry* 265(1): 231–239.
- Hider R., Yoshimura E., Khodr H. und von Wirén** (2004): Competition or complementation: the iron-chelating abilities of nicotianamine and phytosiderophores. In: *New Phytologist* 164: 204–208.
- Higuchi K., Kanazawa K., Nishizawa N.K., Chino M. und Mori S.** (1994): Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots. In: *Plant and Soil* 165(2): 173–179.
- Higuchi K., Suzuki K., Nakanishi H., Yamaguchi H., Nishizawa N. und Mori S.** (1999): Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. In: *Plant Physiology* 119(2): 471–480.
- Himelblau E. und Amasino R.M.** (2000): Delivering copper within plant cells. In: *Current Opinion in Plant Biology* 3(3): 205–210.
- Hocking P.J. und Pate J.S.** (1977): Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. In: *Annals of Botany* 41(6): 1259–1278.
- IDT - Oligo Analyzer** (): <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.
- Inoue H., Higuchi K., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S. und Nishizawa N.** (2003): Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells

- involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. In: *Plant Journal* 36(3): 366–381.
- Ishimaru Y., Suzuki M., Tsukamoto T., Suzuki K., Nakazono M., Kobayashi T., Wada Y., Watanabe S., Matsushashi S., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2006): Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. In: *Plant Journal* 45(3): 335–346.
- Jakoby M., Wang H.Y., Reidt W., Weisshaar B. und Bauer P.** (2004): FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *FEBS Letters* 577(3): 528–534.
- Karsai A., Muller S., Platz S. und Hauser M.** (2002): Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. In: *BioTechniques* 32(4): 790–792, 794–796.
- Kim S., Takahashi M., Higuchi K., Tsunoda K., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2005): Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. In: *Plant and Cell Physiology* 46(11): 1809–1818.
- Kim S.A. und Guerinot M.L.** (2007): Mining iron: iron uptake and transport in plants. In: *FEBS Letters* 581(12): 2273–2280.
- Kim S.A., Punshon T., Lanzirotti A., Li L., Alonso J.M., Ecker J.R., Kaplan J. und Guerinot M.L.** (2006): Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. In: *Science* 314(5803): 1295–1298.
- Klatte M. und Bauer P.** (2008): Accurate real-time reverse transcription quantitative PCR. In: T. Pfannschmidt (Hg.), *Plant Signal Transduction*, Band 479 von *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. In Druck.
- Kobayashi T., Nakayama Y., Itai R.N., Nakanishi H., Yoshihara T., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2003): Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterogeneous tobacco plants. In: *Plant Journal* 36(6): 780–793.
- Koike S., Inoue H., Mizuno D., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S. und Nishizawa N.** (2004): OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. In: *Plant Journal* 39(3): 415–424.
- Korshunova Y.O., Eide D., Clark W.G., Guerinot M.L. und Pakrasi H.B.** (1999): The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. In: *Plant Molecular Biology* 40(1): 37–44.
- Kristensen I. und Larsen P.O.** (1974): Azetidine-2-carboxylic acid derivatives from seeds of *Fagus silvatica* L. and a revised structure for nicotianamine. In: *Phytochemistry* 13(12): 2791–2798.
- Krämer U., Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I. und Salt D.E.** (2000): Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. In: *Plant Physiology* 122(4): 1343–1353.
- Krüger C., Berkowitz O., Stephan U.W. und Hell R.** (2002): A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. In: *Journal of Biological Chemistry* 277(28): 25 062–25 069.

- Laibach F.** (1907): Zur Frage nach der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich. In: *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* XXII, Abt. I: 191–210.
- Laibach F.** (1943): *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. In: *Bot. Archiv.* 44: 439–455.
- Lane B., Kajioka R. und Kennedy T.** (1987): The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. In: *Biochemistry and Cell Biology* 65(11): 1001–1005.
- Lanquar V., Lelièvre F., Bolte S., Hamès C., Alcon C., Neumann D., Vansuyt G., Curie C., Schröder A., Krämer U., Barbier-Brygoo H. und Thomine S.** (2005): Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. In: *EMBO Journal* 24(23): 4041–4051.
- Le Jean M., Schikora A., Mari S., Briat J.F. und Curie C.** (2005): A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. In: *Plant Journal* 44(5): 769–782.
- León P. und Sheen J.** (2003): Sugar and hormone connections. In: *Trends in Plant Science* 8(3): 110–116.
- Li L., Cheng X. und Ling H.Q.** (2004): Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. In: *Plant Molecular Biology* 54(1): 125–136.
- Li Y., Rosso M.G., Strizhov N., Viehoveer P. und Weisshaar B.** (2003): GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. In: *Bioinformatics* 19(11): 1441–1442.
- Ling H., Bauer P., Berczky Z., Keller B. und Ganai M.** (2002): The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21): 13 938–13 943.
- Ling H., Koch G., Bäumlein H. und Ganai M.** (1999): Map-based cloning of *chloronerva*, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(12): 7098–7103.
- Ling H.Q., Pich A., Scholz G. und Ganai M.** (1996): Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. In: *Molecular and General Genetics* 252(1-2): 87–92.
- Ma J.F., Ueno D., Zhao F.J. und McGrath S.P.** (2005): Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. In: *Planta* 220(5): 731–736.
- Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L., Lobinski R., Briat J.F., Lebrun M. und Czernic P.** (2006): Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. In: *Journal of Experimental Botany* 57(15): 4111–4122.
- Marschner H.** (1995): *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, 2. Auflage.
- Masters B.A., Kelly E.J., Quaife C.J., Brinster R.L. und Palmiter R.D.** (1994): Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(2): 584–588.
- Mercer J.F.** (2001): The molecular basis of copper-transport diseases. In: *Trends in Molecular Medicine* 7(2): 64–69.

- Mizuno D., Higuchi K., Sakamoto T., Nakanishi H., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2003): Three nicotianamine synthase genes isolated from maize are differentially regulated by iron nutritional status. In: *Plant Physiology* 132(4): 1989–1997.
- Mori S.** (1999): Iron acquisition by plants. In: *Current Opinion in Plant Biology* 2(3): 250–253.
- van de Mortel J.E., Villanueva L.A., Schat H., Kwekkeboom J., Coughlan S., Moerland P.D., van Themaat E.V.L., Koornneef M. und Aarts M.G.M.** (2006): Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. In: *Plant Physiology* 142(3): 1127–1147.
- Mukherjee I., Campbell N.H., Ash J.S. und Connolly E.L.** (2006): Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. In: *Planta* 223(6): 1178–1190.
- Murata Y., Ma J.F., Yamaji N., Ueno D., Nomoto K. und Iwashita T.** (2006): A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. In: *Plant Journal* 46(4): 563–572.
- Nakanishi H., Yamaguchi H., Sasakuma T., Nishizawa N. und Mori S.** (2000): Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. In: *Plant Molecular Biology* 44(2): 199–207.
- Negishi T., Nakanishi H., Yazaki J., Kishimoto N., Fujii F., Shimbo K., Yamamoto K., Sakata K., Sasaki T., Kikuchi S., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2002): cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. In: *Plant Journal* 30(1): 83–94.
- Neumann G., Haake C. und Römheld V.** (1999): Improved HPLC method for determination of phytosiderophores in root washings and tissue extracts. In: *Journal of Plant Nutrition* 22(9): 1389–1402.
- Noma M., Noguchi M. und Tamaki E.** (1971): A new amino acid, nicotianamine, from tobacco leaves. In: *Tetrahedron Letters* 12(22): 2017–2020.
- Ogo Y., Itai R.N., Nakanishi H., Inoue H., Kobayashi T., Suzuki M., Takahashi M., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2006): Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. In: *Journal of Experimental Botany* 57(11): 2867–2878.
- Ogo Y., Itai R.N., Nakanishi H., Kobayashi T., Takahashi M., Mori S. und Nishizawa N.K.** (2007): The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. In: *Plant Journal* .
- Outten C.E. und O'Halloran T.V.** (2001): Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. In: *Science* 292(5526): 2488–2492.
- Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L. und Drake R.** (2005): Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. In: *Nature Biotechnology* 23(4): 482–487.
- Palmgren M.G.** (2001): PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 817–845.

- Perovic D., Tiffin P., Douchkov D., Bäumlein H. und Graner A.** (2007): An integrated approach for the comparative analysis of a multigene family: The nicotianamine synthase genes of barley. In: *Functional and Integrative Genomics* 7(2): 169–179.
- Petit J.M., van Wuytswinkel O., Briat J.F. und Lobréaux S.** (2001): Characterization of an iron-dependent regulatory sequence involved in the transcriptional control of *AtFer1* and *ZmFer1* plant ferritin genes by iron. In: *Journal of Biological Chemistry* 276(8): 5584–5590.
- Pianelli K., Mari S., Marquès L., Lebrun M. und Czernic P.** (2005): Nicotianamine over-accumulation confers resistance to nickel in *Arabidopsis thaliana*. In: *Transgenic Research* 14(5): 739–748.
- Pich A. und Scholz G.** (1993): The relationship between the activity of various iron-containing and iron-free enzymes and the presence of nicotianamine in tomato seedlings. In: *Physiologia Plantarum* 88(1): 172–178.
- Pich A. und Scholz G.** (1996): Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. In: *Journal of Experimental Botany* 47(294): 41–47.
- Pich A., Scholz G. und Stephan U.W.** (1994): Iron-dependent changes of heavy-metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of 2 tomato genotypes - Nicotianamine as possible copper translocator. In: *Plant and Soil* 165(2): 189–196.
- Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Gogolin K.A. und Ye H.** (2006): Copper cofactor delivery in plant cells. In: *Current Opinion in Plant Biology* 9(3): 256–263.
- Price J., Laxmi A., Martin S.K.S. und Jang J.C.** (2004): Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell* 16(8): 2128–2150.
- Procházka Z. und Scholz G.** (1984): Nicotianamine, the ‘normalizing factor’ for the auxotroph tomato mutant *Chloronerva*; a representative of a new class of plant effectors. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 40(8): 794–801.
- Puig S., Andrés-Colás N., García-Molina A. und Peñarrubia L.** (2007): Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. In: *Plant Cell and Environment* 30(3): 271–290.
- Puig S. und Thiele D.J.** (2002): Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 6(2): 171–180.
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C. und O’Halloran T.V.** (1999): Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. In: *Science* 284(5415): 805–808.
- Reichman S. und Parker D.** (2002): Revisiting the metal-binding chemistry of nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid. Implications for iron nutrition in strategy II plants. In: *Plant Physiology* 129(4): 1435–1438.
- Rhee S.Y., Beavis W., Berardini T.Z., Chen G., Dixon D., Doyle A., Garcia-Hernandez M., Huala E., Lander G., Montoya M., Miller N., Mueller L.A., Mundodi S., Reiser L., Tacklind J., Weems D.C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J. und Zhang P.** (2003): The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. In: *Nucleic Acids Research* 31(1): 224–228.

- Roberts L.A., Pierson A.J., Panaviene Z. und Walker E.L.** (2004): Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. In: *Plant Physiology* 135(1): 112–120.
- Robinson N., Procter C., Connolly E. und Guerinot M.** (1999): A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. In: *Nature* 397(6721): 694–697.
- Rodríguez F.I., Esch J.J., Hall A.E., Binder B.M., Schaller G.E. und Bleecker A.B.** (1999): A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. In: *Science* 283(5404): 996–998.
- Roje S.** (2006): S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. In: *Phytochemistry* 67(15): 1686–1698.
- Römheld V. und Marschner H.** (1986): Evidence for a Specific Uptake System for Iron Phytosiderophores in Roots of Grasses. In: *Plant Physiology* 80(1): 175–180.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T.** (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Auflage.
- Samuelson A.I., Martin R.C., Mok D.W. und Mok M.C.** (1998): Expression of the yeast FRE genes in transgenic tobacco. In: *Plant Physiology* 118(1): 51–58.
- Schaaf G., Ludewig U., Erenoglu B.E., Mori S., Kitahara T. und von Wirén N.** (2004): ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. In: *Journal of Biological Chemistry* 279(10): 9091–9096.
- Schaaf G., Schikora A., Haeberle J., Vert G., Ludewig U., Briat J.F., Curie C. und von Wirén N.** (2005): A Putative Function for the *Arabidopsis* Fe-Phytosiderophore Transporter Homolog AtYSL2 in Fe and Zn Homeostasis. In: *Plant and Cell Physiology* 46(5): 762–774.
- Schmidke I. und Stephan U.W.** (1995): Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. In: *Physiologia Plantarum* 95: 147–153.
- Scholz G.** (1965): Über Aufnahme, Verteilung und Wirkung von Eisenchelat bei einer chlorotischen Tomatenmutante. In: *Kulturpflanze* 13(1): 239–245.
- Scholz G.** (1967): Physiologische Untersuchungen an der Mutante *chloronerva* von *Lycopersicon esculentum*. In: *Kulturpflanze* 15(1): 255–266.
- Scholz G., Becker R., Pich A. und Stephan U.W.** (1992): Nicotianamine - A common constituent of strategy I and II of iron acquisition by plants: a review. In: *Journal of Plant Nutrition* 15(10): 1647–1665.
- Scholz G. und Böhme H.** (1961): Versuche zur Normalisierung des Phänotyps der Mutante *chloronerva* von *Lycopersicon esculentum* Mill. II. Über die Wirkung artfremder Pfropfpartner und verschiedener Pflanzenextrakte auf den Normalisierungsvorgang. In: *Kulturpflanze* 9(1): 181–191.
- Scholz G. und Böhme H.** (1980): Biochemical mutants in higher plants as tools for chemical and physiological investigations — A survey. In: *Kulturpflanze* 28: 11–32.
- Scholz G. und Rudolph A.** (1968): A biochemical mutant of *Lycopersicon esculentum* Mill. Isolation and properties of the ninhydrinpositive "normalizing factor". In: *Phytochemistry* 7(10): 1759–1764.
- Schwertmann U.** (1991): Solubility and dissolution of iron oxides. In: *Plant and Soil* 130(1-2): 1–25.
- Sekimoto H., Hoshi M., Nomura T. und Yokota T.** (1997): Zinc Deficiency Affects the Levels of Endogenous Gibberellins in *Zea mays* L. In: *Plant and Cell Physiology* 38(9): 1087–1090.

- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J.D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M. und Goff S.A.** (2002): A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. In: *Plant Cell* 14(12): 2985–2994.
- Sheline C.T., Behrens M.M. und Choi D.W.** (2000): Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. In: *Journal of Neuroscience* 20(9): 3139–3146.
- Stephan U.W. und Procházka Z.** (1989): Physiological disorders of the nicotianamine-auxotroph tomato mutant *chlaronerva* at different levels of iron nutrition: I. growth characteristics and physiological abnormalities related to iron and nicotianamine supply. In: *Acta Botanica Neerlandica* 38(2): 147–153.
- Sturm J. und Sturm J.G.** (1796): *Deutschlands Flora in Abbildungen*. Stuttgart.
- Sugiura Y., Tanaka H., Mino Y., Ishida T., Ota N., Inoue M., Nomoto K., Yoshioka H. und Takemoto T.** (1981): Structure, properties, and transport mechanism of iron(III) complex of mugineic acid, a possible phytosiderophore. In: *Journal of the American Chemical Society* 103(23): 6979 – 6982.
- Suzuki K., Higuchi K., Nakanishi H., Nishizawa N. und Mori S.** (1999): Cloning of Nicotianamine Synthase Genes from *Arabidopsis thaliana*. In: *Soil science and Plant nutrition* 45(4): 993–1002.
- Suzuki K., Nakanishi H., Nishizawa N. und Mori S.** (2001): Analysis of upstream region of nicotianamine synthase gene from *Arabidopsis thaliana*: presence of putative ERE-like sequence. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65(12): 2794–2797.
- Suzuki K., Shimada K., Nozoe S., Tanzawa K. und Ogita T.** (1996): Isolation of nicotianamine as a gelatinase inhibitor. In: *Journal of Antibiotics* 49(12): 1284–1285.
- TAIR - The Arabidopsis Information Resource** (): <http://www.arabidopsis.org/>.
- Takagi S.** (1976): Naturally occurring iron-chelating compounds. in oat- and rice-root washing. I. Activity measurement and preliminary characterization. In: *Soil science and plant nutrition* 22(4): 423–433.
- Takahashi M., Nakanishi H., Kawasaki S., Nishizawa N.K. und Mori S.** (2001): Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. In: *Nature Biotechnology* 19(5): 466–469.
- Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S. und Nishizawa N.** (2003): Role of Nicotianamine in the Intracellular Delivery of Metals and Plant Reproductive Development. In: *Plant Cell* 15(6): 1263–1280.
- Takemoto T., Nomoto K., Fushiya S., Ouchi R., Kusano G., Hikino H., Takagi S., Matuura Y. und Kakudo M.** (1978): Structure of mugineic acid, a new amino acid possessing an ironchelating activity from roots washing of water-cultured *Hordeum vulgare* L.. In: *Proc. Jpn. Acad.* 54-B 54-B: 469–473.
- The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics** (): <http://bbc.botany.utoronto.ca/>.
- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M. und Schroeder J.I.** (2000): Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9): 4991–4996.

- Tiffin L.O.** (1966): Iron Translocation I. Plant Culture, Exudate Sampling, Iron-Citrate Analysis. In: *Plant Physiology* 41(3): 510–514.
- Tolay I., Erenoglu B., Römheld V., Braun H.J. und Cakmak I.** (2001): Phytosiderophore release in *Aegilops tauschii* and *Triticum* species under zinc and iron deficiencies. In: *Journal of Experimental Botany* 52(358): 1093–1099.
- Trampczynska A., Böttcher C. und Clemens S.** (2006): The transition metal chelator nicotianamine is synthesized by filamentous fungi. In: *FEBS Letters* 580: 3173–3178.
- Valko M., Morris H. und Cronin M.T.D.** (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. In: *Current Medicinal Chemistry* 12(10): 1161–1208.
- Van Wuytswinkel O., Vansuyt G., Grignon N., Fourcroy P. und Briat J.F.** (1999): Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. In: *Plant Journal* 17(1): 93–97.
- Varotto C., Maiwald D., Pesaresi P., Jahns P., Salamini F. und Leister D.** (2002): The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Journal* 31(5): 589–599.
- Vasconcelos M., Datta K., Oliva N., Khalekuzzaman M., Torrizo L., Krishnan S., Oliveira M., Goto F. und Datta S.K.** (2003): Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. In: *Plant Science* 164: 371–378.
- Vert G., Briat J. und Curie C.** (2003): Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. In: *Plant Physiology* 132(2): 796–804.
- Vert G., Grotz N., Dedaldechamp F., Gaymard F., Guerinot M., Briat J. und Curie C.** (2002): IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. In: *Plant Cell* 14(6): 1223–1233.
- Vorwieger A., Gryczka C., Czihal A., Douchkov D., Tiedemann J., Mock H.P., Jakoby M., Weisshaar B., Saalbach I. und Bäumlein H.** (2007): Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. In: *Planta* 226(1): 147–158.
- Wang H.Y.** (2006): *Functional Analysis of iron-regulated basic helix-loop-helix transcription factor genes essential for regulation of iron mobilization in dicotyledonous plants*. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Wang H.Y., Klatter M., Jakoby M., Bäumlein H., Weisshaar B. und Bauer P.** (2007): Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta* 226(4): 897–908.
- Waters B., Blevins D. und Eide D.** (2002): Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. In: *Plant Physiology* 129(1): 85–94.
- Waters B.M., Chu H.H., Didonato R.J., Roberts L.A., Easley R.B., Lahner B., Salt D.E. und Walker E.L.** (2006): Mutations in *Arabidopsis yellow stripe-like1* and *yellow stripe-like3* reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. In: *Plant Physiology* 141(4): 1446–1458.
- Waters B.M. und Grusak M.A.** (2007): Whole-plant mineral partitioning throughout the life cycle in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia, Landsberg erecta, Cape Verde Islands, and the mutant line *ysl1ysl3*. In: *New Phytologist* .
- Weber G., von Wirén N. und Hayen H.** (2008): Investigation of ascorbate-mediated iron release from ferric phytosiderophores in the presence of nicotianamine. In: *BioMetals* .

- Weber M., Harada E., Vess C., Roepenack-Lahaye E. und Clemens S.** (2004): Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. In: *Plant Journal* 37(2): 269–281.
- Weis J.H., Tan S.S., Martin B.K. und Wittwer C.T.** (1992): Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. In: *Trends in Genetics* 8(8): 263–264.
- White M.C.** (1981b): Metal Complexation in Xylem Fluid : II. THEORETICAL EQUILIBRIUM MODEL AND COMPUTATIONAL COMPUTER PROGRAM. In: *Plant Physiology* 67(2): 301–310.
- WHO** (2001): *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control*. World Health Organization.
- WHO** (2004b): *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- WHO** (2006): *Guidelines on food fortification with micronutrients*. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Willems G., Dräger D.B., Courbot M., Godé C., Verbruggen N. und Saumitou-Laprade P.** (2007): The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci. In: *Genetics* 176(1): 659–674.
- von Wirén N., Klair S., Bansal S., Briat J., Khodr H., Shioiri T., Leigh R. und Hider R.** (1999): Nicotianamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants. In: *Plant Physiology* 119(3): 1107–1114.
- von Wirén N., Mori S., Marschner H. und Romheld V.** (1994): Iron Inefficiency in Maize Mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) Is Caused by a Defect in Uptake of Iron Phytosiderophores. In: *Plant Physiology* 106(1): 71–77.
- Wu H., Li L., Du J., Yuan Y., Cheng X. und Ling H.Q.** (2005): Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant and Cell Physiology* 46(9): 1505–1514.
- Wätjen W., Haase H., Biagioli M. und Beyersmann D.** (2002): Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. In: *Environmental Health Perspectives* 110 Suppl 5: 865–867.
- Yanagisawa S., Yoo S.D. und Sheen J.** (2003): Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. In: *Nature* 425(6957): 521–525.
- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. und Potrykus I.** (2000): Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. In: *Science* 287(5451): 303–305.
- Yi Y. und Guerinot M.** (1996): Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. In: *Plant Journal* 10(5): 835–844.
- Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A. und Sawada H.** (2001): A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(Pt 1): 89–103.

Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L. und Grissem W. (2004): GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. In: *Plant Physiology* 136(1): 2621–2632.

Liste der Publikationen

Im Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen

- Bauer P., Berczky Z., Brumbarova T., Klatte M. und Wang H.Y.** (2004a): Molecular regulation of iron uptake in the dicot species *Lycopersicon esculentum* and *Arabidopsis thaliana*. In: *Soil Science and Plant Nutrition* 50(7): 997–1001.
- Bauer P., Thiel T., Klatte M., Berczky Z., Brumbarova T., Hell R. und Grosse I.** (2004b): Analysis of sequence, map position, and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in *Arabidopsis* and tomato. In: *Plant Physiology* 136(4): 4169–4183.
URL <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.047233>
- Wang H.Y., Klatte M., Jakoby M., Bäumlein H., Weisshaar B. und Bauer P.** (2007): Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Planta* 226(4): 897–908. **H.Y. Wang & M. Klatte** trugen zu gleichen Teilen zu der Arbeit bei.
URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-007-0535-x>
- Klatte M. und Bauer P.**, Accurate real-time reverse transcription quantitative PCR. In: T. Pfannschmidt, Hg., *Plant Signal Transduction, Methods in Molecular Biology*, Bd. 479 (Humana Press 2008). In Druck.
- Klatte M., Schuler M., Wirtz M., Fink-Straube C., Hell R. und Bauer P.** (2008): *Arabidopsis thaliana* nicotianamine synthase mutants show requirement of nicotianamine for iron deficiency responses and nickel tolerance. In: *The Plant Journal (eingereicht)* .

Posterbeiträge auf Tagungen

- Klatte M., Hell R. und Bauer P.** (März 2003): Gene families involved in Nicotianamine metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*. AFGN Konferenz (Wittenberg) .
- Klatte M., Hell R. und Bauer P.** (April 2004): Gene families involved in Nicotianamine metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*. 1st Trinational Arabidopsis Conference (Wien, Österreich) .
- Klatte M., Wirtz M., Hell R. und Bauer P.** (Juli 2006a): Analysis of the nicotianamine synthase gene family in the network of iron deficiency responses in *Arabidopsis thaliana*. 13. International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (Montpellier, Frankreich) .
- Klatte M., Wirtz M., Hell R. und Bauer P.** (April 2006b): Analysis of the nicotianamine synthase gene family in the network of iron deficiency responses in *Arabidopsis thaliana*. 3rd Trinational Arabidopsis Conference (Tübingen) .

Weitere Publikationen

Pecinka A., Schubert V., Meister A., Kreth G., Klätte M., Lysak M.A., Fuchs J. und Schubert I. (2004): Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. In: *Chromosoma* 113(5): 258–269.

URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-004-0316-2>

Schubert I., Pecinka A., Meister A., Schubert V., Klätte M. und Jovtchev G. (2004): DNA damage processing and aberration formation in plants. In: *Cytogenetics and Genome Research* 104(1-4): 104–108.

URL <http://dx.doi.org/10.1159/000077473>

Schubert V., Klätte M., Pecinka A., Meister A., Jasencakova Z. und Schubert I. (2006): Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. In: *Genetics* 172(1): 467–475.

URL <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.048363>

Danksagungen

Als erstes möchte ich Frau Junior Prof. Dr. Petra Bauer dafür danken, dass Sie mir die Durchführung der Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Des weiteren danke ich ihr für die Betreuung und die vielfältigen, im Rahmen der Arbeit gegebenen Anregungen. Auch danke ich ihr besonders für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Jörn Walter danke ich besonders für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hell (Universität Heidelberg) danke ich als Mitinitiator des Projekts für das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die Übernahme des Koreferats. Besonderer Dank gilt ihm auch für die Ermöglichung, die HPLC Analyse im Rahmen dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe etablieren und durchführen zu können. Weiter möchte ich ihm besonders für die vielen interessanten und anregenden Diskussionen danken.

Herrn Dr. Markus Wirtz (Universität Heidelberg) danke ich besonders für die technische Unterstützung bei der Etablierung der HPLC Analyse im Rahmen dieser Arbeit sowie die in diesem Zusammenhang geführten interessanten und anregenden Diskussionen.

Frau Dr. Claudia Fink-Straube (INM Saarbrücken) sowie Frau Traudel Allgayer danke ich besonders für die Unterstützung bei der analytischen Bestimmung der Metallgehalte der Pflanzenproben.

Allgemein danke ich meinen Kollegen am IPK Gatersleben und an der Universität des Saarlandes für die stets freundliche und gute Zusammenarbeit in einem angenehmen Arbeitsklima. Besonders danke ich dabei Frau Dr. Hong-Yu Wang, Frau Julia Fleischer-Dietrich, Herrn Dr. Zsolt Bereczky und Herrn Lingam Brahmasivasenkar für die stets interessanten und anregenden Diskussionen und die entgegengebrachte Unterstützung. Frau Almudena Ortega Gómez, Frau Mara Schuler und Herrn Felix Maurer danke ich für die interessante Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen in ihren jeweiligen Praktika.

Frau Angelika Anna und Frau Sarah Hassel (Universität Heidelberg) danke ich für die technische Unterstützung bei Arbeiten im Labor sowie der Pflege der Pflanzen. Frau Monika Schäfer gilt mein herzlicher Dank für ihre hilfreiche Unterstützung nicht nur bei administrativen Fragen.

Zu guter letzt gilt mein Dank ganz besonders meiner lieben Frau Sabina sowie meinem Sohn Lukas. Die von ihnen mir während dieser Zeit entgegengebrachte Unterstützung und Liebe war für den Erfolg dieser Arbeit von ganz besonderer Wichtigkeit.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Marco Klatte
Geburtsdatum und -ort	13. September 1975 in Kassel
Familienstand	verheiratet
Kinder	1 Sohn (*02.08.2005) und 1 Tochter (*11.08.2008)
Staatsangehörigkeit	deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

Okt. 1996 - Aug. 2002	Studium der Biologie an der Universität Kassel
Okt. 2001 - Aug. 2002	Diplomarbeit am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, AG „Karyotypevolution“ (Prof. Dr. I. Schubert) mit dem Titel <i>„Untersuchungen zur Chromosomenorganisation in Interphase Zellkernen von Arabidopsis thaliana mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung“</i>
Nov. 2002 - Mai 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben, AG „Pflanzenstress und Entwicklung“ (Dr. P. Bauer)
Mai 2005 - Dez. 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken, Lehrstuhl für Botanik (Jun. Prof. Dr. P. Bauer).