

**Eisenmangelinduzierbare bHLH Transkriptionsfaktoren
der Untergruppe Ib(2)
in der Eisenhomöostase von *Arabidopsis thaliana*
und im Kontext hormoneller Signale**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer.nat.)

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

von Herr

Felix Maurer

geboren am 28.11.1977 in Saarbrücken

Juni 2012

Tag des Kolloquiums: 16.11.2012

Dekan: Prof. Dr. V. Helms

Berichterstatter: Prof . Dr. P. Bauer
Prof . Dr. U. Müller

Vorsitz: Prof . Dr. I. Bernhardt

Akad. Mitarbeiter: Dr. B. Heidtmann

“Ein Experte ist jemand, der auf einem sehr kleinen Gebiet schon alle möglichen Fehler gemacht hat”

(Nils Bohr, dänischer Physiker)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 1 -
1. Abkürzungsverzeichnis	- 6 -
2. Zusammenfassung	- 7 -
3. Einleitung	- 9 -
3.1 Eisen: Ein zentrales Element für alle Organismen.....	- 9 -
3.2 Der Weg des Eisens in und innerhalb der Pflanze	- 10 -
3.2.1 Freisetzung und Aufnahme von Eisen aus dem Boden	- 10 -
3.2.1.1 Eisenaufnahmestrategie I.....	- 10 -
3.2.1.2 Eisenaufnahmestrategie II.....	- 12 -
3.2.2 Eisentransport zwischen Pflanzenorganen und auf zellulärem Level.....	- 13 -
3.2.2.1 vaskulärer Transport von Eisen.....	- 13 -
3.2.2.2 Intrazellulärer Eisentransport und Speicherung.....	- 14 -
3.2.3 Die Familie der bHLH Proteine in Pflanzen.....	- 15 -
3.2.4 Die Rolle der bHLH Proteine in der Regulation der Eisenhomöostase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 17 -
3.2.4.1 bHLH Proteine in der Eisenaufnahme	- 17 -
3.2.4.2 Regulation des Eisentransports in <i>Arabidopsis thaliana</i> durch Proteine der bHLH Familie.....	- 19 -
3.2.5 Die bHLH Unterfamilie Ib im Kontext der Eisenhomöostase.....	- 21 -
3.3 Das Netzwerk der Stresshormone	- 24 -
3.3.1 Die Steuerung der Eisenaufnahme durch hormonelle Signale.....	- 24 -
3.3.2 Salizylat.....	- 25 -
3.3.3 Jasmonat.....	- 29 -
3.4 Vorarbeiten	- 31 -
3.4.1 Effekte von Jasmonat auf die IRT1 Promotoraktivität (Maurer et al., 2011) -	31 -
3.4.2 Auswirkungen des Lipoxygenaseinhibitors Ibuprofen auf die Eisenmangelantwort (Maurer et al., 2011)	- 31 -
3.4.3 Kreuzung von bHLH Einzelmutanten zur Kultivierung von homozygoten bHLH Mehrfachmutanten.....	- 32 -

Inhaltsverzeichnis

4.	Ziele dieser Arbeit	- 33 -
4.1	Verifikation und detaillierte Charakterisierung einer bHLH Dreifachmutante zur Untersuchung der Genfunktionen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 33 -
4.2	Untersuchung des Einflusses von Salizylat auf die Eisenhomöostase im WT, der <i>3xbhlh</i> Mutante und in SA-Netzwerkmutanten.....	- 34 -
4.3	Bestätigung und Untersuchung einer Überexpressionslinie zur individuellen Charakterisierung der Aufgaben des <i>BHLH39</i> in der Eisenhomöostase.....	- 35 -
4.4	Untersuchung der posttranslationalen Regulation von bHLH39 bei Eisenmangel und durch hormonelle Signale.....	- 35 -
4.5	Untersuchung der Rolle des Phytohormons Jasmonat in der Regulation der Eisenaufnahmemaschinerie.....	- 36 -
5.	Material und Methoden	- 37 -
5.1	Material	- 37 -
5.1.1	Pflanzen.....	- 37 -
5.1.1.1	Arabidopsis T-DNA Insertionslinien:.....	- 38 -
5.1.2	Bakterienstämme.....	- 38 -
5.1.3	Vektoren.....	- 39 -
5.1.4	Oligonukleotide.....	- 41 -
5.1.4.1	Genotypisierungsprimer.....	- 41 -
5.1.4.2	Primer für quantitative Real Time Reverse Transkriptase PCR.....	- 41 -
5.1.4.3	Primer zur Erstellung der <i>BHLH38</i> miRNA.....	- 43 -
5.1.5	Antikörper	- 44 -
5.1.5.1	Anti-HA	- 44 -
5.1.6	Enzyme und Kits.....	- 44 -
5.1.7	Geräte	- 45 -
5.1.8	Software	- 45 -
5.1.9	Pflanzenmedien.....	- 46 -
5.2	Methoden	- 47 -
5.2.1	Pflanzenbiologische Techniken	- 47 -
5.2.1.1	Pflanzenzucht.....	- 47 -
5.2.1.2	Wurzeltrennungssystem.....	- 47 -

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	RNA Analysen	- 48 -
5.2.2.1	Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR).....	- 48 -
5.2.2.2	Expressionsanalyse mittels Mikroarray	- 51 -
5.2.3	DNA Analysen.....	- 53 -
5.2.3.1	Genotypisierungs PCR.....	- 53 -
5.2.4	Proteinanalysen	- 54 -
5.2.4.1	Western Blot	- 54 -
5.2.4.2	Reduktaseassay	- 55 -
5.2.5	Pharmakologische und hormonelle Analysen.....	- 55 -
5.2.6	Methoden der analytischen Chemie.....	- 56 -
5.2.6.1	Metallmessung	- 56 -
5.2.7	Molekularbiologische Techniken.....	- 56 -
5.2.7.1	Gatewayklonierung	- 57 -
5.2.7.2	Klonierungsstrategie zur Erstellung eines <i>BHLH38</i> miRNA exprimierenden Vektors.....	- 57 -
6.	Ergebnisse	- 60 -
6.1	Verifizierung und Charakterisierung der <i>3xbhlh</i> Mutante zur Untersuchung der Genfunktionen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 60 -
6.1.1	Kreuzung von bHLH Einfachmutanten zur Erhaltung einer homozygoten <i>3xbhlh</i> Mutante.....	- 60 -
6.1.2	Untersuchung phänotypischer Merkmale in Abhängigkeit der Eisenversorgung.....	- 62 -
6.1.3	Genexpressionsstudien der Eisenmangelmarkergene <i>FIT</i> , <i>FRO2</i> und <i>IRT1</i> in Wurzeln und <i>FRO3</i> , <i>YSL1</i> und <i>FER1</i> in Blättern der <i>3xbhlh</i> Mutante.....	- 66 -
6.1.4	Messung des Eisengehalts in der <i>3xbhlh</i> Mutante	- 69 -
6.1.5	Test der Reduktaseaktivität in der <i>3xbhlh</i> Mutante	- 70 -
6.1.6	Kultivierung einer <i>4xbhlh</i> Mutante mittels RNA Interferenz mit dem Ziel einer vollständigen Ib(2) bHLH Nullmutante	- 71 -
6.1.7	Genomweite Genexpressionsstudie der <i>bhlh</i> Dreifachmutante im Vergleich zum WT mittels Mikroarray Chip.....	- 75 -
6.1.7.1	Differentiell regulierte Eisenmarker in der <i>3xbhlh</i> Mutante im Vergleich zum WT	- 77 -

Inhaltsverzeichnis

6.1.8	Genexpressionsstudien der Eisenhomöostase im Kontext des Salizylsäurenetzwerks im WT und der <i>3xbhlh</i> Mutante	82 -
6.1.8.1	Genexpressionsstudien von Eisenhomöostasegenen in den SA-Netzwerkmutanten <i>npr1</i> , <i>NahG</i> und <i>sid2</i> im Vergleich zum WT	86 -
6.1.8.2	Untersuchung differentiell exprimierter Eisenmangelgene in der <i>3xbhlh</i> Mutante im Vergleich zum WT bei Eisenmangel unter Einfluss von SA	89 -
6.1.8.3	Untersuchung differentiell regulierter Gene in der <i>3xbhlh</i> Mutant bei Eisenmangel unter Einfluss von SA	93 -
6.1.8.4	Vergleich der Analysen eisenmangel- und SA-induzierbarer Gene in WT und <i>3xbhlh</i> Mutante	96 -
6.2	Verifizierung und Charakterisierung einer <i>3xHA-BHLH39</i> Überexpressionslinie	102 -
6.2.1	Verifikation des <i>3xHA-BHLH39</i> Konstruktes auf Transkript- und Proteinebene in unabhängigen <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien	102 -
6.2.1.1	Phänotypische Charakterisierung der <i>BHLH39</i> Überexpressionslinie JM78-5	106 -
6.2.1.2	Genexpressionsanalyse der Eisenhomöostasegene in <i>BHLH39</i> Überexpressionspflanzen der Linie JM78-5	109 -
6.2.1.3	Metallgehaltsbestimmung in der <i>BHLH39</i> Überexpressionslinie JM78-5 ..	113 -
6.2.1.4	Kolorimetrischer Eisenreduktaseassay	114 -
6.2.2	Regulation des bHLH39 Proteinlevels bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung	116 -
6.2.3	Charakterisierung der <i>BHLH39</i> Überexpressionslinie auf Proteinebene bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung im Kontext hormonaler Netzwerke	117 -
6.3	Regulation der Eisenmangelantwort durch Jasmonat (Maurer et al., 2011)	122 -
6.3.1	Expressionsanalyse der Eisenaufnahmegene unter Einfluss von Jasmonat und Ibuprofen	122 -
6.3.2	Genexpressionsanalyse der Eisenmangelgene in der jasmonatresistenten Mutante <i>jar1-1</i>	125 -
6.3.3	Genexpression in der <i>fit</i> Mutante bei Behandlung mit Jasmonat	127 -
6.3.4	Analyse der jasmonatinsensitiven Mutante <i>coi1-1</i> im Wurzeltrennungssystem	129 -

Inhaltsverzeichnis

7.	Diskussion	- 131 -
7.1	<i>BHLH38</i> ist zur Aufrechterhaltung der Eisenaufnahme ausreichend	- 131 -
7.2	Transkriptomanalyse der <i>3xbhlh</i> Mutante zeigt veränderte Expression von eisensensitiven Genen in Übereinstimmung mit der <i>fit</i> Mutante und induziert im Vergleich zur <i>ein3/eil1</i> Mutante	- 132 -
7.3	SA kann die Expression der Eisenaufnahmegene nicht induzieren.....	- 136 -
7.4	Transkriptomanalyse der <i>3xbhlh</i> Mutante zeigt veränderte Regulation von Seneszenz- und Abwehrgenen des Salizylsäurenetzwerks	- 137 -
7.5	Das Transkriptom der <i>3xbhlh</i> Mutante zeigt die größte Anzahl differentiell regulierter Gene bei Eisenmangel	- 143 -
7.6	Regulation der Gruppen I – IV durch SA und die vier bHLHs der Untergruppe Ib(2)	- 145 -
7.7	Mikroarrayanalyse gibt Hinweise auf differentielle Expression von Genen im Zusammenhang der inneren Uhr in der <i>3xbhlh</i> Mutante.....	- 151 -
7.8	<i>BHLH39</i> ist ein positiver Regulator der Eisenaufnahme	- 154 -
7.9	Die <i>BHLH39</i> Überexpression führt zu einer Akkumulation von Fe.....	- 155 -
7.10	Die <i>BHLH39</i> Aktivität wird auf mehreren Ebenen reguliert	- 158 -
7.11	Salizylsäure trägt zur Feinabstimmung der <i>bHLH39</i> Proteinmenge in geringem Maße bei, Ethylen dagegen nicht.....	- 161 -
7.12	Jasmonsäure dient zur Feinabstimmung der Eisenmangelantwort	- 162 -
7.13	Jasmonat wirkt als negativer Regulator der Eisenaufnahme	- 162 -
7.14	Ibuprofen und die <i>coi1-1</i> Mutation unterbinden das systemische Eisensignal nicht	- 164 -
7.15	Mögliche Funktionen der jasmonatvermittelten Inhibition der Eisenaufnahme	- 165 -
8.	Zusammenfassung und Perspektiven	- 166 -
9.	Anhang	- 169 -
10.	Referenzen	- 199 -
11.	Danksagung	- 219 -
12.	Lebenslauf	- 220 -
13.	Publikationsliste	- 221 -

1. Abkürzungsverzeichnis

Col-0	Columbia-0
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
bHLH	basische Helix Loop Helix
ET	Ethylen
Fe	Eisen
hpRNA	hairpin RNA
AAS	Atomic Absorption Spectrometry
JA	Jasmonat
MeJA	Methyljasmonat
MS	Mugineinsäure
MU	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronsäure
NA	Nicotianamin
PS	Phytosiderophore
qRT-PCR	quantitativ Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SA	Salizylat
WT	Wildtyp

2. Zusammenfassung

Die Eisenhomöostase ist fundamental für ernährungstechnische Eigenschaften von Nahrungsmittelpflanzen wie den Eisengehalt. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* werden die 4 basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Gene *BHLH38/39/100/101* durch Eisenmangel verstärkt exprimiert, während *BHLH38/39* zusätzlich Jasmonat- (JA) und Salizylsäure- (SA) abhängig reagieren. Sie induzieren bei Eisenmangel mit dem bHLH Transkriptionsfaktor FIT die Eisen(III)reduktase *FRO2* und den Eisentransporter *IRT1*.

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktionen dieser 4 bHLH Gene in der Eisenhomöostase in *Arabidopsis thaliana* und die Erforschung systemischer Signale zur Regulation der Homöostase. Es wurde getestet, ob die Hormone JA und SA als mögliche Signale der Eisenmangelantwort dienen. Die Studie zeigte, dass JA die *FRO2* und *IRT1* Genexpression negativ reguliert. Es wurde festgestellt, dass JA nicht als systemisches Signal der ausreichenden Eisenversorgung agiert.

Um die bHLH Funktionen zu untersuchen, wurde eine bHLH Dreifachmutante (*3xbhlh*) sowie eine *bHLH39* Überexpressionslinie, detailliert charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die 4 Gene dieser Gruppe redundant sind und positiv auf die Eisenmangelantwort wirken, so dass *BHLH38* alleine in der *3xbhlh* Mutante zur deren Aufrechterhaltung ausreicht. Eine Mikroarrayanalyse der *3xbhlh* Mutante gibt Hinweise darauf, dass die 4 Gene möglicherweise einen Knotenpunkt zwischen Stresssignalen und den Zielgenen der Eisenhomöostase bilden.

Summary

The iron homeostasis is fundamental for dietary traits of crop plants such as iron content. In the model plant *Arabidopsis thaliana* the 4 basic Helix-Loop-Helix (bHLH) genes *BHLH38/39/100/101* are up regulated under iron deficiency, whereas *BHLH38/39* react in addition jasmonate- (JA) and salicylic acid- (SA) dependent. Under iron deficiency they induce together with the bHLH transcription factor FIT the ferric chelate reductase *FRO2* and the iron transporter *IRT1*.

The goal of the project was the investigation of functions of this 4 bHLH genes in the iron homeostasis of *Arabidopsis thaliana* and the elucidation of systemic signals regulating the homeostasis. It was tested if the hormones SA and JA serve as signals for the iron deficiency response. The study showed that JA regulates the *FRO2* and *IRT1* gene expression in a negative manner. The role of JA was not found to be related to systemic signaling of Fe sufficiency responses.

To evaluate the bHLH gene functions, a bHLH triple mutant plant (*3xbhlh*) and a *bHLH39* over-expression line were characterized in detail. The results suggest redundancy for the 4 genes of this group, which have positive effects on the iron deficiency response, so that *BHLH38* is sufficient for maintenance of the iron deficiency response in the *3xbhlh* mutant. However, a comparative microarray study of the *3xbhlh* mutant indicates that this 4 genes may be a nodal point connecting stress signals and iron homeostasis.

3. Einleitung

3.1 Eisen: Ein zentrales Element für alle Organismen

Eisen ist ein essentielles Spurenelement für fast alle Lebensformen auf der Erde. Die Fähigkeit in den stabilen Oxidationsformen Fe(II) und Fe(III) aufzutreten, gibt Eisen als Katalysator vieler biologischer Redoxreaktionen fundamentale Bedeutung. Als Teil der Elektronentransferketten in Mitochondrien und Chloroplasten sowie der DNA-, Hormon- und Lipidbiosynthese ist es zentraler Bestandteil fast aller lebenden Organismen (Balk und Lobréaux, 2005; Marschner, 1995). Da Eisen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Hydroxylradikalen in der Fenton Reaktion katalysiert, die das Potential haben Biomoleküle zu beschädigen, liegt Eisen in biologischen Geweben gewöhnlich nie als freies Element, sondern meist an Chelatoren gebunden vor (Fenton, 1894; Hell und Stephan, 2003).

Sowie ein Überschuss an Eisen toxisch wirken kann, hat auch ein Mangel des Spurenelements negative Folgen. Eisenmangelzustände führen unabhängig von der Art des Organismus zu Leistungseinbußen. In Pflanzen sind die Folgen je nach Schweregrad Blattchlorosen aufgrund geringerer Chloroplastenanzahl und damit verbunden verminderter Photosyntheseaktivität. Dadurch werden Wachstum und Biomasse der Pflanze beeinträchtigt.

Im menschlichen Körper sind die Folgen einer Anämie allgemein der Verfall der körperlichen und mentalen Leistungsfähigkeit, da Eisen unter anderem als Kofaktor des Häms am Sauerstofftransport beteiligt ist. Zu Eisenmangel kommt es häufig dann, wenn vorwiegend hypokalorische vegetarische Kost genossen wird, wie es in vielen Drittweltländern aufgrund der schlechten Ernährungssituation der Fall ist. Allerdings sind Risikogruppen für Eisenmangel nicht nur auf Länder der Dritten Welt beschränkt, allgemein haben z.B. Kinder im Wachstum und Frauen während Schwangerschaft und Menstruation einen erhöhten Eisenbedarf und können dadurch schneller an einer Unterversorgung erkranken. Da insgesamt ein Viertel der Weltbevölkerung an Eisenmangelanämie leidet gibt es zahlreiche Bestrebungen Nahrungsmittelpflanzen mit verwertbarem Eisen anzureichern. Dabei wird durch Düngung, Kreuzung und Einsatz gentechnischer Methoden versucht Nahrungsmittelpflanzen zu kultivieren, die mehr und besser verwertbares Eisen enthalten. Als Grundlage solcher Bemühungen ist es daher

unbedingt notwendig die molekularen Mechanismen der Eisenhomöostase in Pflanzen noch genauer zu erforschen.

3.2 Der Weg des Eisens in und innerhalb der Pflanze

3.2.1 Freisetzung und Aufnahme von Eisen aus dem Boden

Eisen kommt zwar mengenmäßig in allen Böden ausreichend vor, es liegt dort allerdings hauptsächlich in oxidiertem Fe(III) Form vor. Die Löslichkeit dieser oxidierten Form ist besonders im neutralen oder basischen Milieu sehr gering, daher ist Fe(III) für Pflanzen schwer zugänglich (Marschner, 1995). Freie Fe(III) Ionen sind bei pH 7 in der wässrigen Umgebung des Bodens auf Konzentrationen von etwa 10^{-17} M limitiert, während Pflanzen für optimales Wachstum eigentlich 10^{-6} M benötigen (Hell und Stephan, 2003). Da mehr als ein Viertel aller Böden alkalisch sind, haben Pflanzen morphologische und physiologische Anpassungen entwickelt um Eisen zur Aufnahme aus dem Boden freizusetzen. So wird die Morphologie der Wurzel durch subapikale Verdickung und die vermehrte Bildung von Wurzelhaaren angepasst um die Wurzeloberfläche und damit die Aufnahmefläche zu erhöhen (Marschner, 1995). Physiologische Anpassungen höherer Pflanzen an Eisenmangelsituationen sind die beiden Mechanismen Strategie I und Strategie II (Römheld und Marschner, 1986). Die Strategie I basiert dabei auf Reduktion von Eisen, während bei Strategie II das Eisen durch Chelatierung aufgenommen wird (Römheld und Marschner, 1986). Beide Strategien werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben:

3.2.1.1 Eisenaufnahmestrategie I

Die Strategie wird von allen Dikotyledonen und denjenigen Monokotyledonen angewandt, die nicht zur Familie der Gräser gehören. Diese Pflanzen säuern das umgebende Substrat bei Eisenmangel an, um die Löslichkeit des Metalls zu erhöhen, anschließend wird Eisen reduziert und aufgenommen. In der Modellpflanze Arabidopsis ist dieser Vorgang weitestgehend erforscht: Zuerst wird der Boden um die Wurzel durch die H⁺-ATPase AHA2 (ARABIDOPSIS H⁺-ATPASE2) protoniert (Palmgren, 2001; Santi und Schmidt, 2009) (Abb. 1). Dadurch werden Fe(III) und andere Metallkationen aus Chelaten herausgelöst und können von der plasmamembranständigen Eisenreduktase FRO2 (FERRIC REDUCTASE OXIDASE2) im subapikalen Bereich der

Einleitung

Wurzelepidermis zu Fe(II) reduziert werden (Connolly et al., 2003; Robinson et al., 1999). Man nimmt an, dass diese Reduktion der Eisenkationen der limitierende Schritt der Eisenaufnahmestrategie I ist (Grusak et al., 1990). Anschließend kann das reduzierte Fe(II) vom divalenten Metalltransporter IRT1 (IRON REGULATED TRANSPORTER1) aufgenommen werden, der auch andere zweiwertige Metallkationen transportiert (Eide et al., 1996; Vert et al., 2002). Das eigentliche Eisenmangelsignal, das diese Mechanismen in Gang setzt ist bisher unbekannt, die transkriptionelle Induktion der Gene *FRO2* und *IRT1* bei Eisenmangel erfolgt allerdings über den bHLH Transkriptionsfaktor FIT im Komplex mit bHLH Proteinen der Gruppe Ib (Yuan et al., 2008). Die H⁺-ATPase *AHA2* wird bei Eisenmangel ebenfalls verstärkt exprimiert, dazu ist FIT notwendig, allerdings alleine nicht ausreichend (Santi und Schmidt, 2009; Ivanov et al., 2011). Daher ist es möglich, dass FIT im Komplex mit bHLH Proteinen der Gruppe Ib auch die *AHA2* Expression reguliert. Eine detaillierte Beschreibung der Regulation der Eisenaufnahmestrategie I, auch Eisenmangelantwort genannt, durch die Familie der bHLH Transkriptionsfaktoren befindet sich unter Abschnitt 3.2.4.1.

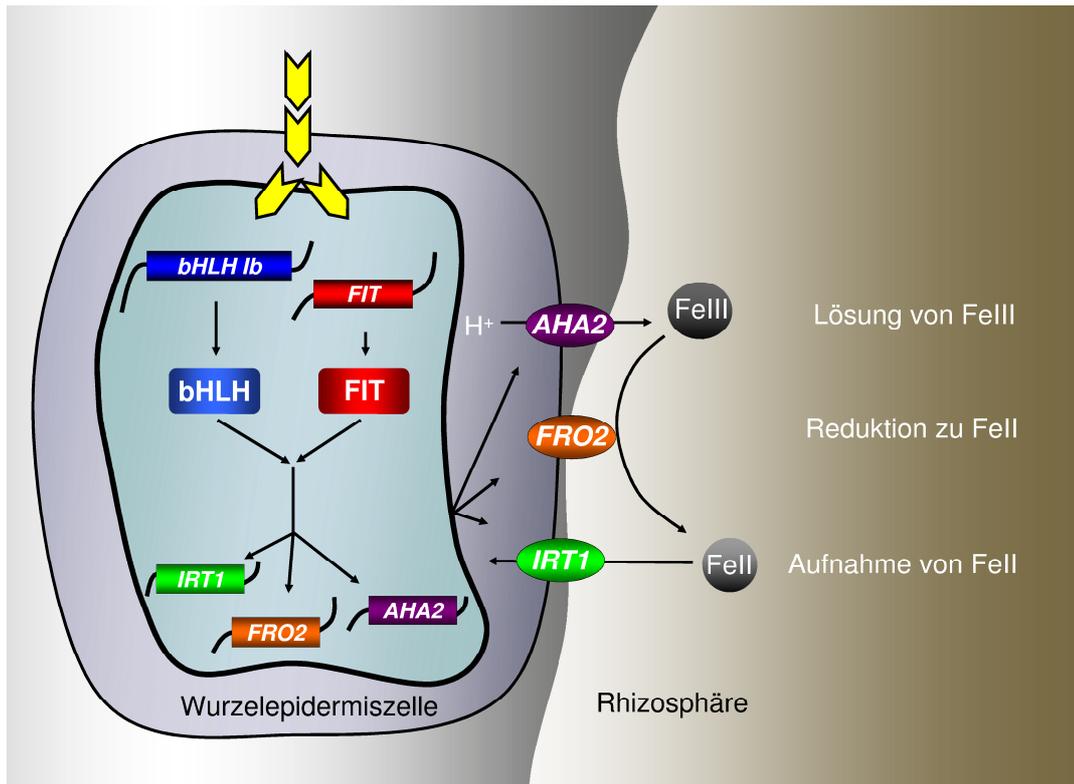


Abb. 1: Eisenaufnahmestrategie I in *Arabidopsis thaliana*

Ein unbekanntes Eisenmangelsignal (gelber Pfeil) erreicht bei Eisenknappheit die Zellen der Wurzelepidermis. Dort wird das Signal in den Kern weitergeleitet und induziert die Transkription und Translation von *FIT* und der *bHLH Ib* Transkriptionsfaktoren. *FIT* interagiert dann wahrscheinlich mit den *bHLH Ib* Transkriptionsfaktoren *BHLH38* und *BHLH39* um in einem Heterokomplex die Transkription der H^+ -ATPase *AHA2*, der Eisen(III)-Reduktase *FRO2* und des Fe^{II} -Transporters *IRT1* zu induzieren. Die H^+ -ATPase protoniert dann die Rhizosphäre, wodurch Fe^{III} gelöst wird. Fe^{III} wird von der Eisenreduktase *FRO2* zu Fe^{II} reduziert und von *IRT1* aufgenommen. Adaptiert von Ivanov et al., 2011.

3.2.1.2 Eisenaufnahmestrategie II

Die auf Chelatierung des Eisens basierende Strategie II wird von allen monokotyledonen Gräsern wie z.B. Mais (*Zea mays*), Gerste (*Hordum vulgare*) und Weizen (*Triticum aestivum*) angewandt. Um schwerlösliche Formen wie Eisenhydroxide zu lösen, sekretieren die monokotyledonen Gräser niedrigmolekulare organische Chelatoren, die Phytosiderophore (PS) genannt werden und Fe^{III} binden können. Die PS werden aus Methionin über die Zwischenstufe Nikotianamin (NA) gebildet und gehören zur Familie der Mugineinsäuren (MS) (Takagi, 1976; Takagi et al., 1984; Mori, 1999). Sie sind in der Lage Fe^{III} und andere Metallkationen zu komplexieren und werden als Fe^{III} -PS Komplexe über *YS1* (YELLOW STRIPE1) in die Wurzelepidermis aufgenommen

(Curie et al., 2001). Allerdings ist die Einteilung in Strategie I und II nicht ohne Ausnahmen. Trotz der Einteilung zu den Strategie II Pflanzen ist Reis nicht allein auf diesen Mechanismus angewiesen. Bei Eisenmangel induzieren Reispflanzen sowohl die Aufnahme von Fe(III)-MS Komplexen, als auch die Aufnahme von Fe(II) über OsIRT1, einem Homolog des Arabidopsisgens *IRT1* (Ishimaru et al., 2006).

Die Regulation der Strategie II in Reis läuft vermutlich über den eisenmangelinduzierbaren bHLH Transkriptionsfaktor *OsIRO2* (*RICE IRON-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR2*; OsbHLH056) und die konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktoren *OsIDEF1* (*IDE BINDING FACTOR1*) und *OsIDEF2* ab. OsIRO2 induziert bei Eisenmangel Gene der PS-Synthese und den Fe(III)-PS Transporter *OsYSL15* (Ogo et al., 2007) und wird selbst von OsIDEF1 positiv reguliert (Kobayashi et al., 2009; Kobayashi et al., 2007). *OsIDEF1* und *OsIDEF2* reagieren auf Eisenmangel und erkennen die regulatorischen Elemente OsIDE1 (*IRON DEFICIENCY-RESPONSIVE ELEMENT1*) und OsIDE2, die zur eisenmangelspezifischen Induktion von Genen dienen, die die Eisenaufnahme erhöhen (Kobayashi et al., 2003; Kobayashi et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Ogo et al., 2008). Unabhängig von der Strategie werden nach der Eisenaufnahme in die Wurzelepidermis Transport und Speicherungsmechanismen aktiv.

3.2.2 Eisentransport zwischen Pflanzenorganen und auf zellulärem Level

3.2.2.1 vaskulärer Transport von Eisen

Nach dem aktiven Transport des Eisens in den Symplast der Wurzelepidermiszellen kann das Eisen frei durch den Symplasten oder Apoplasten der Epidermis und des Kortex diffundieren. Ab der Endodermis ist dann aufgrund des Casparystreifens nur noch ein symplastischer Transport möglich (Marschner, 1995). Da ein großer Teil des aufgenommenen Eisens in photosynthetisch aktivem Gewebe, das heißt in den Chloroplasten, benötigt wird (Terry und Abadia, 1986) muss Eisen über längere Strecken zu den Blättern transportiert werden. Nach dem Passieren der Endodermis wird Eisen daher aktiv in das Xylem geladen und mit dem Transpirationsstrom in den Spross transportiert. Wie genau Eisen in das Xylem und über Chelatoren zum Bedarfsort transportiert wird und in welcher Art ein Transport aus dem Xylem stattfindet, ist

allerdings unklar. Man nimmt an, dass Eisen in Form von Fe(III)-Zitrat Komplexen über den Transporter FRD3 (FERRIC REDUCTASE DEFECTIVE3) der MATE (Multidrug And Toxin Efflux) Familie ins Xylem geladen werden und über die Vaskulatur voll ausgebildete Pflanzenorgane erreicht (Rogers und Guerinot, 2002; Green und Rogers, 2004; Durrett et al., 2007). Da der Transpirationsstrom im Xylem sich entwickelnder Organe wie Sprossapex, Wurzelspitze und Samen allerdings zum Eisentransport noch unzureichend ist, nimmt man an, dass Eisen dort auch über das Phloem transportiert wird. Das Be- und Entladen des Phloems läuft möglicherweise über den eisenmangelinduzierbaren OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER 3 (OPT3) ab (Stacey et al., 2008), dessen Funktion besonders wichtig für die Versorgung der Samen zu sein scheint, da *opt3-1* KO Mutanten einen embryolethalen Phänotyp besitzen (Stacey et al., 2002). Um im Phloemsaft mit einem pH von >7 das Eisen an der Ausfällung zu hindern, muss es allerdings an Chelatoren gebunden werden. Als Kandidat für die Komplexierung des Eisens im Phloem wird das, in Arabidopsis, von 4 Nikotianaminsynthasen (AtNAS1, AtNAS2, AtNAS3, AtNAS4) gebildete Nikotianamin angesehen, da es in allen Geweben vorkommt und bei einem neutralen bis schwach alkalischen pH stabile Komplexe mit Fe(II) ausbildet (von Wiren et al., 1999). Es wird angenommen, dass im Spross Fe(II)-Nikotianaminkomplexe über Transporter der YELLOW STRIPE-LIKE (YSL) Familie transportiert werden (Curie et al., 2009; Klatter et al., 2009). Diese Annahme beruht auf der Entdeckung von Sequenzübereinstimmungen zwischen den YSL Genen in Arabidopsis und dem Gen YELLOW STRIPE1 (ZmYS1) aus Mais, das für einen Transporter von PS-Fe(III) Chelaten codiert (Curie et al., 2001; Roberts et al., 2004; Schaaf et al., 2004). Obwohl ein Beweis für diese Theorie fehlt, weisen bisherige Ergebnisse darauf hin, dass YSL Transporter eine Rolle im Langstrecken- und intrazellulären Transport von Fe-NA Komplexen spielen.

Nach der Verteilung über die Vaskulatur erreicht das Eisen die Zielorgane. Am Bedarfsort wird Eisen dann in die Zellen transportiert und dort in die jeweiligen Organellen weiterverteilt.

3.2.2.2 Intrazellulärer Eisentransport und Speicherung

Über den Transport und die Speicherung von Eisen innerhalb von Pflanzenzellen besitzen wir nur teilweise Kenntnis, es ist aber wahrscheinlich, dass die Vakuolen eine Rolle als Speicherort spielen. Der Speicherung und Freigabe von Eisen aus der Vakuole liegt wahrscheinlich ein Import/Export Mechanismus über die Transporter VIT1

(VACUOLAR IRON TRANSPORTER1) und NRAMP3 bzw. NRAMP4 (NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 3/4) zugrunde. Der Transporter VIT1 importiert Fe(II) in die Vakuole (Kim et al., 2006), während bei Eisenmangel NRAMP3 und NRAMP4 Eisen aus der Vakuole exportieren (Thomine et al., 2003; Lanquar et al., 2005). Neben den Vakuolen wird auch Eisen in unterschiedlichen Plastiden der Pflanze gespeichert (Seckback, 1982). Dort kann Eisen durch Eisenspeicherproteine, sogenannte Ferritine, gebunden werden (Briat et al., 2010). Ferritine besitzen die Fähigkeit bis zu 4500 Eisenatome zu speichern (Briat et al., 2010). In Arabidopsis sind 4 Ferritine bekannt (FER1- FER4) die in einzelnen Geweben und Organen unterschiedlich exprimiert werden (Petit et al., 2001). Die Expression der Ferritine wird induziert durch Faktoren wie hohe Eisenkonzentrationen in der Pflanze, oxidativer Stress oder während der Blattseneszenz und bei Befall durch manche Pathogene (Boughammoura et al., 2007; Briat et al., 2010; Murgia et al., 2007). Kürzlich konnte zudem noch gezeigt werden, dass die Eisenhomöostase in Arabidopsis über die Ferritine mit der inneren Uhr der Pflanze in Verbindung steht, da der Regulator der inneren Uhr TIC (TIME FOR COFFEE) reprimierende Effekte auf die *FER1* Expression hat (Duc et al., 2009).

Wie die vakuolären Transporter VIT1 und NRAMP3/4 reguliert werden ist bisher nicht vollständig geklärt. In den folgenden Abschnitten wird sowohl auf die Regulation der Eisenaufnahme in die Pflanze (siehe 3.2.4.1), als auch auf die Regulation der Eisenverteilung innerhalb der Pflanze (siehe 3.2.4.2) eingegangen, an denen maßgeblich bHLH Transkriptionsfaktoren beteiligt sind.

3.2.3 Die Familie der bHLH Proteine in Pflanzen

Basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine sind eine Klasse von Transkriptionsfaktoren mit hoch konservierter bHLH Domäne. Erstmals wurde das Motiv in Transkriptionsfaktoren der Muskelentwicklung von Mäusen entdeckt (Murre et al., 1989), kommt aber in vielen eukaryotischen Organismen vor. Speziell in Pflanzen sind die bHLH Proteine die zweithäufigste Gruppe von Transkriptionsfaktoren und dienen dort als Regulatoren der Physiologie, des Metabolismus und der Entwicklung (Feller et al., 2011). Man nimmt an, dass die bHLH Transkriptionsfaktoren sich in der Pflanzenwelt kurz vor oder nach der Entstehung der ersten Landpflanzen verbreitet

Einleitung

haben, da bHLH Proteine sowohl in Samenpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*, als auch in den ersten Landpflanzen überhaupt sehr häufig vertreten sind, während sie in Grün- und Rotalgen wesentlich weniger zahlenmäßig vorkommen (Pires und Dolan, 2010b). In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* kennt man 158 bHLH Proteine von denen sich 146 in eine von 26 Unterfamilien einteilen lassen (Pires und Dolan, 2010a).

Allen gemeinsam ist die etwa 50-60 Aminosäuren lange bHLH Domäne. Sie besteht aus 10-15 meist basischen Aminosäuren am N-terminalen Ende (basische Domäne), gefolgt von zwei aliphatischen α -Helices (Helix-Loop-Helix Region) von insgesamt etwa 40 Aminosäuren Länge, die durch einen Loop variabler Länge getrennt sind (Toledo-Ortiz et al., 2003; Pires und Dolan, 2010a; Feller et al., 2011) (Abb. 2). Die doppelte Helix am C-terminalen Ende dient zur Dimerisierung (Murre et al., 1989; Ferre-D'Amare et al., 1994), wobei Homodimere und auch Heterodimere mit anderen bHLH Proteinen ausgebildet werden können, um eine DNA Bindung über die basische Region zu ermöglichen (Ma et al., 1994; Shimizu et al., 1997; Jones, 2004). Die Bindung an die DNA kann über ein konserviertes DNA Sequenzmotiv bestehend aus 6 Nukleotiden ablaufen, das E-Box (5'-CANNTG-3') genannt wird. Abhängig von den Basen 3 und 4 der Konsensussequenz existieren unterschiedliche E-Box Motive, von denen eines der häufigsten die sogenannte G-Box (5'-CACGTG-3') ist (Toledo-Ortiz et al., 2003).

Reguliert werden durch die bHLH Transkriptionsfaktoren in Pflanzen z.B. Vorgänge wie die Lichtwahrnehmung über PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIF) oder die Regulation abiotischer Faktoren wie die Eisenhomöostase (Ling et al, 2002; Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005; Wang et al., 2007; Lau und Deng, 2010; Long et al., 2010)

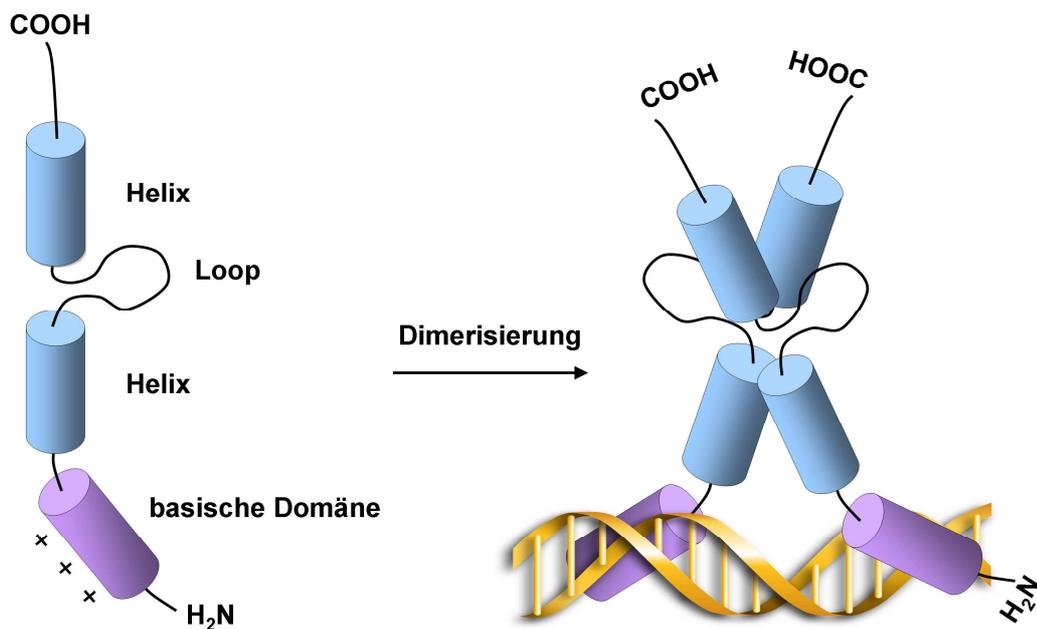


Abb. 2: Struktur und Funktionsweise der bHLH Domäne

bHLH Domänen sind etwa 50-60 Aminosäuren lang. Im Bereich des N-Terminus sind 10-15 meist basischen Aminosäuren lokalisiert (basische Domäne), gefolgt von zwei aliphatischen α -Helices (Helix-Loop-Helix Region) von insgesamt etwa 40 Aminosäuren Länge, die durch einen Loop variabler Länge getrennt sind. Die doppelte Helix am C-terminalen Ende dient zur Dimerisierung (Murre et al., 1989) wobei Homodimere und auch Heterodimere mit anderen bHLH Proteinen ausgebildet werden können, um eine DNA Bindung über die basische Region zu ermöglichen. Die meist positive Ladung der basischen Domäne vereinfacht die Bindung an das negativ geladene Rückgrat der DNA.

3.2.4 Die Rolle der bHLH Proteine in der Regulation der Eisenhomöostase in *Arabidopsis thaliana*

Der Eisenhaushalt von Pflanzen umfasst die Eisenaufnahme aus dem Substrat, den Transport innerhalb der Pflanze zu Bedarfsorten und die Eisenspeicherung. Jeder dieser Teilbereiche wird bedarfsabhängig reguliert, um die perfekte Konzentration des Elements zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu gewährleisten. In diesen Regulationsprozessen spielen einige bHLH Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle.

3.2.4.1 bHLH Proteine in der Eisenaufnahme

Dem Weg des Eisens in die Pflanze folgend, wird hier zuerst der Einfluss der bHLH Proteine auf die Eisenaufnahme beschrieben und im nächsten Abschnitt ihre Rolle in der Regulation des Transports innerhalb der Pflanze betrachtet. Die Aufnahme bei

Einleitung

Eisenmangel in Dikotyledonen wird durch den bHLH Transkriptionsfaktor FER in Tomaten und sein Ortholog BHLH029, auch bekannt als FIT, in Arabidopsis reguliert (Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005; Bauer et al., 2004). *FIT* ist notwendig für die Induktion von *FRO2* und *IRT1* bei Eisenmangel und ist damit ein zentraler Aktivator der Eisenaufnahme (Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004). Bei Abwesenheit von *FIT* in der *fit* Mutante ist eine Aktivierung der Strategie I nicht mehr möglich und führt zu reduziertem Eisengehalt und starken Chlorosen (Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005). In der *fit* Mutante ist bei Eisenmangel nicht nur die Anzahl der *FRO2* Transkripte stark vermindert, auch zeigt die Reduktase wesentlich geringere Aktivität als im WT (Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005). Die *IRT1* Expression ist ebenfalls vermindert, allerdings gibt es Mutanten wie *fit1-1*, die *IRT1* bei Eisenmangel noch abgeschwächt induzieren können, allerdings ist in *fit* Mutanten kein IRT1 Protein detektierbar (Colangelo und Guerinot, 2004). Daher ist es möglich, dass *IRT1* und *FRO2* unterschiedlich von *FIT* reguliert werden (Colangelo und Guerinot, 2004; Zhang et al., 2006). Wie dagegen FIT selbst reguliert wird und in welcher Form Eisenmangel an FIT signalisiert wird, ist nicht ganz klar. Allerdings konnte bei konstitutiver Überexpression von *FIT* in Arabidopsis eine ektopische Expression in Blättern festgestellt werden, die nur unter Eisenmangel eine stärkeren *FRO2* und *IRT1* Expression hervorrief (Jakoby et al., 2004). Dieses Ergebnis führte zu der Frage, ob *FIT* posttranskriptionell reguliert wird. Kürzlich gab es Untersuchungen, die diese Annahme unterstützen, indem gezeigt wurde, dass FIT unter Eisenmangel beständigem Abbau und Neusynthese unterworfen ist (Meiser et al., 2011; Sivitz et al., 2011). Da FIT Fusionsproteine in diesen Experimenten bei der Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid kaum detektiert werden konnten, die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 aber das genaue Gegenteil zeigte, ist es wahrscheinlich, dass der FIT Abbau über den 26S Proteasom erfolgt (Lingam et al., 2011; Sivitz et al., 2011; Meiser et al., 2011). Dieser Mechanismus soll möglicherweise dazu dienen „verbrauchtes“ FIT Protein von den Promotoren der Zielgene zu entfernen und gegen neusynthetisiertes aktives FIT zu ersetzen. Laut Lingam et al. 2011 wird die Stabilität von FIT in Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren ETYLENE INSENSITIVE3 (EIN3) und ETYLENE INSENSITIVE3-LIKE 1 (EIL1) des Ethylensignalwegs erhöht. Die EIN3/EIL1 Transkription wird bei Eisenmangel induziert (García et al., 2010). Ethylen gilt allgemein als Phytohormon, das einen positiven Einfluss auf die Eisenmangelantwort hat (siehe auch 3.3.1) (Romera und Alcantara,

1994; Lucena et al., 2006; Waters et al., 2007). Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurde dann auch ein Rückgang der FIT Proteinmenge bei Behandlung von WT Pflanzen mit dem Ethylensyntheseinhibitor AVG oder in der *ein3/eil1* Doppelmutante beobachtet, so dass angenommen wird, dass die von Lingam et al. 2011 publizierte Interaktion von FIT mit EIN3/EIL1 den Abbau verhindert (Lingam et al., 2011).

Man nahm an, dass FIT aber zumindest noch mit einer anderen Gruppe von Proteinen interagiert, da in Wurzeln von FIT Überexpressionslinien *FRO2* und *IRT1* bei ausreichender Eisenversorgung nur auf WT Niveau exprimiert werden (Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005). Es erschien daher möglich, dass andere bei Eisenmangel exprimierte bHLH Transkriptionsfaktoren wie die der Unterfamilie Ib mit FIT einen Komplex bilden, um die Expression von *FRO2* und *IRT1* bei Eisenmangel zu induzieren (Colangelo und Guerinot, 2004). Daher wurde 2008 von Yuan et al. die Aufgabe der Ib bHLH Transkriptionsfaktoren innerhalb der Wurzel von Arabidopsispflanzen untersucht. Tatsächlich konnte die Interaktion von FIT mit AtbHLH38 und AtbHLH39 sowie sich selbst in einem BiFC Assay in Arabidopsis Protoplasten beobachtet werden (Yuan et al., 2008). Dann wurde die induzierende Wirkung eines FIT/bHLH38 bzw. bHLH39 Heterokomplexes auch in Arabidopsispflanzen mittels einer Ko-Überexpression der Komplexpartner FIT und bHLH38 bzw. bHLH39 getestet (Yuan et al., 2008). Tatsächlich wurde in diesen Linien ein eisenunabhängig hoher Expressionslevel für *FRO2* und *IRT1* und ein erhöhter Eisengehalt im Spross festgestellt und damit die Theorie untermauert, dass bei Eisenmangel im WT bHLH38 und bHLH39 mit FIT zusammen die Gene der Eisenaufnahme induzieren (Yuan et al., 2008). Die entstehenden Heterokomplexe aus FIT und bHLH38 bzw. bHLH39 regulieren bei Eisenmangel die Expression von *FRO2* und *IRT1* und damit zwei der wichtigsten Eisenaufnahmegene (Yuan et al., 2008). Damit kommt den bHLH Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle in der Eisenaufnahme in *Arabidopsis thaliana* zu.

3.2.4.2 Regulation des Eisentransports in *Arabidopsis thaliana* durch Proteine der bHLH Familie

Betrachtet man die Rolle der bHLH Proteine in der Regulation des Eisentransports innerhalb der Pflanze, scheint ein weiteres System aus bHLH Transkriptionsfaktoren die interne Mobilisierung in der Wurzel und den Transport in den Spross zu regulieren. Einer der zentralen Faktoren der Regulation könnte der eisenmangelinduzierbare bHLH

Einleitung

Transkriptionsfaktor POPEYE (PYE) sein. Seine direkten bei Eisenmangel reprimierten Ziele, die im Zentralzylinder exprimiert werden, sind das Nikotianaminsynthasegen *NAS4* und das eisenmangelinduzierbare Eisenreduktasegen *FRO3* aus der FRO Familie (Long et al., 2010). PYE ist mutmaßlich ein negativer Regulator dieser Gene, der bei Eisenmangel in der gesamten Wurzel exprimiert wird, aber eine besonders starke Induktion im Bereich des Perizykels zeigt (Long et al., 2010). Knock-out Mutantenlinien des Gens (*pye-1*) induzieren die ebenfalls im Bereich des Zentralzylinders exprimierten Gene des Eisenlangstreckentransports *FRD3* und *OPT3* (Green und Rogers, 2004; Stacey et al., 2008) sowie der vakuoläre Eisentransporter *NRAMP4* (Lanquar et al., 2005) und zeigen unter Eisenmangel vermindertes Wurzel- und Wurzelhaarwachstum (Long et al., 2010). Daher stellen die Autoren die Hypothese auf, dass PYE aufgrund seiner Lokalisierung und Zielgene zur Koordination der komplexen transkriptionellen Anpassungen beiträgt, die zur Eisenmangelantwort notwendig sind (Long et al., 2010). KO Mutanten des Transkriptionsfaktors *PYE* (*pye-1*) zeigen zudem einen erhöhten Eisengehalt, aber eine schwächere Toleranz gegenüber Eisenmangel. Diese äußert sich durch eine extrem starke Chlorose nach mehrtägigem Eisenmangel. Es wird spekuliert, dass Eisen in der Mutante durch Deregulation von *NAS4* nicht richtig verteilt wird und daher trotz hoher Konzentrationen des Elements Eisen nicht in die Bedarfsorte der Blätter gelangt. Trotzdem weist die Mutante eine schwächere Eisenmangelantwort auf als der WT, interessanterweise sind eisenmangelinduzierte Gene wie z.B. *BHLH39* und *BHLH101* (Wang et al., 2007) unabhängig von der Eisenversorgung stärker exprimiert als im WT (Long et al., 2010). Aufgrund dieser Hinweise wird angenommen, dass PYE eine Rolle in der Eisentransportregulation von der Wurzel zu den grünen Pflanzenorganen spielt, wobei PYE direkt Gene der Eisenverteilung wie *NAS4* reguliert, aber auch Einfluss auf Transkriptionsfaktorgene der Eisenhomöostase hat (Long et al., 2010). Da das Phloem und Xylem umgebende Gewebe des Perizykels bei Eisenmangel sehr stark transkriptionell aktiv ist, wird spekuliert, dass dort der Status des Eisens in der Pflanze mit dem äußeren Eisenpool abgeglichen wird (Dinneny et al., 2008; Long et al., 2010). Zu diesem Zweck interagiert PYE vermutlich mit den bei Eisenmangel induzierten bHLH Transkriptionsfaktoren IAA LEUCINE RESISTANT3 (ILR3) und bHLH115 (Dinneny et al., 2008; Long et al., 2010). ILR3 und bHLH115 wiederum interagieren mit einer putativen E3 Ligase, genannt BRUTUS (BTS), die Domänen zur Metall und DNA Bindung besitzt und ein PYE ähnliches Expressionsmuster zeigt. In partiellen *bts* Mutanten die *BTS* bei Eisenmangel nicht mehr induzieren, zeigt sich bei

Eisenmangel ein zu *pye-1* Mutanten gegensätzlicher Phänotyp mit längeren Wurzeln und größeren grüneren Sprossen (Long et al., 2010). Daher wird angenommen, dass *bts-1* Pflanzen über eine erhöhte Eisenmangeltoleranz verfügen und der Transkriptionsfaktor BTS gegensätzliche Funktionen zu PYE besitzt und negativ auf die Gene der Eisenaufnahme wirkt (Long et al., 2010). Die Autoren spekulieren, dass die Interaktionen zwischen PYE, ILR3, bHLH115 und BTS zur Regulation der Eisenhomöostase bei Eisenmangel beitragen. Dabei sollen PYE und BTS aufgrund ihrer gegensätzlichen Funktionen die Eisenhomöostase in einer stabilen Balance halten (Long et al., 2010). Genaueres über diesen Mechanismus und die Funktion der einzelnen Gene ist bisher allerdings nicht bekannt.

3.2.5 Die bHLH Unterfamilie Ib im Kontext der Eisenhomöostase

Eine der 26 bHLH Unterfamilien in Pflanzen findet in dieser Arbeit besondere Beachtung. Es handelt sich dabei um die bHLH Unterfamilie Ib. Ausgehend von der Nomenklatur von Heim et al. im Jahr 2003 wurde die Unterfamilie Ib von Pires und Dolan 2010 in zwei neue Untergruppen, mit Namen Ib(1) und Ib(2), aufgeteilt. Bei der Einteilung der Gene in Unterfamilien wurde die Länge der Gene sowie der Proteine, die Anzahl der Introns mit konservierter Position und die Lage der bHLH Domänen berücksichtigt (Heim et al., 2003) und durch Pires und Dolan im Jahr 2010 nach neuesten phylogenetischen Gesichtspunkten überarbeitet (Pires und Dolan, 2010a). Hier soll die Untergruppe Ib(2) näher betrachtet werden. Sie beinhaltet 6 Gene aus *Oryza sativa* und 12 Gene aus *Arabidopsis thaliana*, die aufgrund ihrer ähnlichen Struktur in einer Gruppe zusammengefasst werden (Tabelle 1). Die Gene *AtbHLH038*, *AtbHLH039*, *AtbHLH100*, *AtbHLH101* und *OsbHLH56* bilden aufgrund ihrer Induzierbarkeit durch Eisenmangel eine eigene funktionelle Gruppe innerhalb der Unterfamilie Ib(2) (Wang et al., 2007; Vorwieger et al., 2007; Ogo et al., 2007). Das einzige aus Reis stammende eisenmangelinduzierbare Gen dieser Gruppe *OsbHLH056*, auch *OsIRO2* genannt, zeigt starke Ähnlichkeit zu *BHLH38/39/100* und *101* aus *Arabidopsis* (Zheng et al., 2010). *OsIRO2* reguliert die Expression der Nikotianaminsynthasegene *OsNAS1/2/3*, des Nikotianamin-aminotransferasegens *OsNAATI*, des Deoxymugineinsäuresynthasegens *OsDMAS1* und des *YS1* ähnlichen Eisenphytosiderophortransportergens *OsYSL15* positiv (Ogo et al., 2007). In *OsIRO2* Überexpressionslinien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression der PS-Synthasegene erhöht ist, als auch die Expression des

Einleitung

Fe(III)-MS Transportergens *OsYSL15*, ohne eine verstärkte Eisenaufnahme hervorzurufen (Ogo et al., 2007). Das zeigt an, dass die Eisenaufnahme in Reis durch ein Netzwerk von weiteren Faktoren reguliert wird. Solche Transkriptionsfaktoren sind IDEF1 und IDEF2, die an eisenmangelabhängige Elemente (IDE1 und IDE2) binden und dadurch eine Vielzahl von Eisenhomöostasegenen regulieren (Kobayashi et al., 2003; Kobayashi et al., 2007; Ogo et al., 2008). Unter anderem wird auch *OsIRO2* von IDEF1 positiv beeinflusst und induziert seinerseits die zuvor genannten Gene der Strategie I und möglicherweise auch andere Transkriptionsfaktoren (Kobayashi et al., 2007).

Für die 4 aus Arabidopsis stammenden Gene (Tabelle 1) nimmt man wegen starker DNA Sequenzübereinstimmungen und wahrscheinlich damit verbundenen redundanten Funktionen an, dass *BHLH38* und *BHLH39* sowie *BHLH39* und *BHLH100* durch Duplikationsereignisse auseinander hervorgegangen sind (Heim et al., 2003). Über die Funktion dieser 4 Gene ist manches bekannt, allerdings sind viele Teilaspekte nicht vollständig verstanden. Die 4 Transkriptionsfaktoren sind in Wurzeln im Bereich der Wurzelhaarzone und in Blättern schwach exprimiert, ihre Expression in beiden Geweben wird erst durch Eisenmangel verstärkt induziert, dabei erfolgt die Induktion unabhängig von FIT (Wang et al., 2007). Welches Signal bei Eisenmangel zur Induktion führt ist nicht bekannt. Die Anwesenheit bei Eisenmangel im Wurzel- und Blattgewebe deutet allerdings auf eine komplexe Funktion im Zusammenhang der Eisenhomöostase hin. Bisher konnte nur für *bHLH38* und *bHLH39* gezeigt werden, dass sie bei Eisenmangel Heterokomplexe mit FIT bilden um die Expression von *FRO2* und *IRT1* zu induzieren (Yuan et al., 2008). In Hefe wurde zusätzlich gezeigt, dass die aus der Interaktion entstehenden Komplexe *FRO2* bzw. *IRT1* Promotor-GUS Fusionen induzieren, allerdings war eine höhere *IRT1* Promotor vermittelte GUS Aktivität in denjenigen Hefezellen festgestellt worden, die *AtbHLH39* statt *AtbHLH38* exprimierten (Yuan et al., 2008). In der Tat akkumulierten Pflanzen die *AtbHLH39* überexprimierten auch mehr Eisen als *AtbHLH38* Überexpressionslinien, weshalb die Autoren spekulierten, dass *BHLH39* zusätzliche Funktionen in der Kontrolle der *IRT1* Expression haben könnte und zu diesem Zweck mit einem weiteren unbekanntem Faktor einen Heterokomplex ausbildet, da Homodimere von *bHLH38* oder *bHLH39* nicht beobachtet wurden (Yuan et al., 2008).

Für *bHLH100* und *bHLH101* wurde eine Interaktion mit FIT noch nicht gezeigt, ist aber wahrscheinlich, da *BHLH038*, *BHLH039*, *BHLH100* und *BHLH101* stark redundant erscheinen, wenn man in Betracht zieht, dass Einzelmutanten keinen Phänotyp besitzen

Einleitung

und keinerlei Symptome von Eisenmangel zeigen (Wang et al., 2007). Ungeklärt bleibt allerdings die Funktion der 4 bHLHs bei Eisenmangel in den Blättern, da Interaktionen mit FIT unwahrscheinlich sind, weil FIT außerhalb der Wurzel nur sehr schwach exprimiert wird (Wang et al., 2007). Daher könnten *BHLH038*, *BHLH039*, *BHLH100* und *BHLH101* weitere Funktionen im Zusammenhang der Eisenhomöostase besitzen, die über die Eisenaufnahmeregulation zusammen mit *FIT* hinausgehen. Wang et al. stellten 2007 dazu die Hypothese auf, dass diese 4 bHLHs möglicherweise auf generelle Stresssignale antworten, die durch Eisenmangel ausgelöst werden. Aufgrund ihrer Expression in der Nähe der Vaskulatur in Blättern und Wurzeln könnte es sich um ein vaskuläres systemisches Signal handeln. Zumindest für *BHLH038* und *BHLH039* konnte gezeigt werden, dass sie auf Ethylen und NO reagieren (García et al., 2010; Lucena et al., 2006), sowie auf die systemisch wirkenden Phytohormone Salizylat und Jasmonat (Kang et al., 2003). Sie wurden 2003 daher zusätzlich *ORG2* und *ORG3* benannt (*OBP3 RESPONSIVE GENE*), da sie als direktes Ziel des salizylsäureinduzierbaren Dof (DNA binding with one finger) Transkriptionsfaktors *OBP3* (OBF-BINDIN PROTEIN 3) angesehen werden (Kang et al., 2003). Zuerst wurde eine Koexpression von *OBP3* und *BHLH038* bzw. *BHLH039* in *OBP3*-Überexpressionslinien mit konstitutivem und auch mit induzierbarem Promotor gezeigt. Dann stellte man fest, dass die Expressionslevel von *BHLH38* und *BHLH39* in *OBP3* KO Linien reduziert sind (Kang et al., 2003), was darauf hindeutete, dass *OBP3* als positiver Regulator fungiert. Für den Transkriptionsfaktor *OBP3* wurde später postuliert, dass er Funktionen im Phytochrom und Cryptochromsignalweg zur Regulation der Hypokotylelongation und Kotyledonenexpansion übernimmt (Ward et al., 2005).

Bei Tests mit Jasmonat und Salizylat, wurde die SA-Induzierbarkeit von *BHLH38*, *BHLH39* und *OBP3* Transkripten in Arabidopsis Wurzeln festgestellt und eine Verringerung der *BHLH38* und *BHLH39* Transkriptzahlen unter Einfluss von JA beobachtet (Kang et al., 2003; Kang and Singh, 2000). Inwiefern Jasmonat und Salizylat die Eisenmangelantwort über *BHLH38* und *BHLH39* beeinflussen ist bisher allerdings nicht erforscht.

Gename	Genlokus
	Tair/TIGR
<i>AtbHLH036</i>	AT5G51780
<i>AtbHLH038</i>	AT3G56970
<i>AtbHLH039</i>	AT3G56980
<i>AtbHLH055</i>	AT1G12540
<i>AtbHLH100</i>	AT1G41240
<i>AtbHLH101</i>	AT5G04150
<i>AtbHLH118</i>	AT4G25400
<i>AtbHLH120</i>	AT5G51790
<i>AtbHLH125</i>	AT1G62975
<i>AtbHLH126</i>	AT4G25410
<i>AtbHLH160</i>	AT1G71200
<i>AtbHLH162</i>	AT4G20970
<i>Os bHLH056</i>	LOC_Os01g72370
<i>Os bHLH147</i>	LOC_Os02g34370
<i>Os bHLH168</i>	LOC_Os01g01840
<i>Os bHLH169</i>	LOC_Os01g01870
<i>Os bHLH170</i>	LOC_Os01g33400
<i>Os bHLH172</i>	LOC_Os02g13670

Tabelle 1: Gennamen und zugehöriger Genlokus der bHLH Unterfamilie Ib(2)

18 Mitglieder der bHLH Unterfamilie Ib(2) jeweils 12 Gene aus *Arabidopsis thaliana* und 6 Gene aus *Oryza sativa*, adaptiert von Pires und Dolan, 2010

3.3 Das Netzwerk der Stresshormone

3.3.1 Die Steuerung der Eisenaufnahme durch hormonelle Signale

Es ist bisher nicht klar ob die Eisenaufnahme lediglich lokal von der Wurzel oder durch Langstreckensignale reguliert wird. Experimente im Wurzeltrennungssystem, bei dem nur eine Wurzelhälfte bei ausreichender Eisenversorgung kultiviert wird, zeigen allerdings dass die Induktion der Eisenmangelantwort in der anderen Wurzelhälfte, die in Eisenmangelmedium angezogen wurde, inhibiert wird (Wang et al., 2007; Vert, Briat et al., 2003). Das deutet darauf hin, dass Langstreckensignale existieren die den Eisenstatus in einem Teil der Wurzel an entfernte Pflanzenteile melden. Um das Signal zu identifizieren, das in Pflanzen die Eisenmangelantwort reguliert, wurde in den letzten Jahren eine große Anzahl von Untersuchungen mit Phytohormonen im Kontext der

Eisenhomöostase durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Hormone wie Cytokinin reprimierende Effekte auf die Eisenaufnahme haben, während Auxin, Ethylen und das Signalmolekül NO positiv wirken (Chen et al., 2010; García et al., 2010; García et al., 2011; Lingam et al., 2011; Meiser et al., 2011). Aufgrund ihrer Wirkung auf die Genexpression von *BHLH38* und *BHLH39* werden Salizylat (SA) und Jasmonat (JA) in dieser Arbeit im Kontext der Eisenhomöostase näher untersucht. Daher soll in den folgenden Abschnitten speziell auf deren Netzwerke eingegangen werden, um sie genauer zu charakterisieren. Die Betrachtung ganzer Netzwerke ist zum Verständnis der Hormonwirkung extrem wichtig, da die Signalmoleküle nicht nur eine Vielzahl von Prozessen in der Pflanze modulieren, sondern sich dabei auch abhängig von Konzentration, Reihenfolge des Auftretens und Wirkungsort gegenseitig unterschiedlich beeinflussen.

3.3.2 Salizylat

Allgemein spielt SA zusammen mit den Hormonen Jasmonat (JA) und Ethylen (ET) eine zentrale Rolle in der Resistenz von Pflanzen gegen Pathogene oder Herbivoren (Dong, 1998; Leon-Reyes et al., 2010; Spoel et al., 2003; Pieterse, Leon-Reyes, Van der Ent und Van Wees, 2009), reguliert allerdings auch eine Vielzahl von Antworten auf abiotischen Stressfaktoren wie zum Beispiel extrem hohe oder niedrige Temperaturen, Salzstress und oxidativer Stress (Miura und Ohta, 2010; Larkindale und Knight, 2002; Larkindale et al., 2005; Gunes et al., 2007). Ein Derivat der Salizylsäure, das sogenannte Methylsalizylat, ist ein wichtiges Langstreckensignalmolekül in der systemisch erworbenen Abwehr von Tabak und Arabidopsis (Shulaev et al., 1997; Rivas-San Vicente und Plasencia, 2011). Damit verbunden ist eine der wichtigsten Aufgaben von SA die Vermittlung von Resistenzen gegen biotrophe Pathogene, während JA/ET Signalwege gegen nekrotrophe Krankheitserreger aktiv sind und meist antagonistisch zu SA wirken (Glazebrook, 2005; Shah, 2003). SA führt bei der pflanzlichen Pathogenabwehr nicht nur zur Aktivierung von Abwehrgenen, sondern ist auch zur hypersensitiven Zelltodantwort notwendig (Halim et al., 2006). Diese Immunantwort ist eine Form des programmierten Zelltods am Infektionsort (Hofius et al., 2009), hervorgerufen durch reaktive Sauerstoffspezies. Ziel der Immunantwort ist es das Pathogen vom Rest der Pflanze zu isolieren und eine weitere Ausbreitung zu verhindern (Pieterse et al., 2009). SA ist sowohl für die Pathogenerkennung, als auch für die Ausbildung einer lokalen wie auch systemischen Resistenz in der ganzen Pflanze

Einleitung

notwendig (Grant und Lamb, 2006). Die Akkumulation von SA kann durch Infektion mit verschiedensten Pathogenen oder auch nur durch Behandlung mit Pathogenelicitoren hervorgerufen werden, aber auch Stressbedingungen können zu einer Akkumulation von SA führen. Schon das äußerliche Zuführen von SA oder SA-Analoga ist ausreichend um Resistenzen in der Pflanze auszubilden (Görlach et al., 1996; Lawton et al., 1996). Transgene Pflanzen, die die bakterielle SA Hydroxylase nahG tragen, die SA zu inaktivem Katechol umsetzt, können SA nicht akkumulieren und unterliegen dadurch starken Einschränkungen der Pathogenabwehr (Durrant und Dong, 2004). In WT Pflanzen wird durch lokale Infektionen mit Pathogenen die systemisch erworbene Resistenz (SAR) induziert, indem ein lokales Signal durch die Vaskulatur wandert um Abwehrreaktionen auch in weiter entfernten, nicht befallenen Geweben hervorzurufen (Pieterse, Leon-Reyes, Van der Ent und Van Wees, 2009). Die SAR führt im befallenen Gewebe dann zur hypersensitiven Zelltodantwort, die gegen ein ganzes Spektrum von Pathogenen wirksam ist (Ryals et al., 1995). Die Induktion der SAR wird von einer SA Akkumulation begleitet (Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990) und ruft die Aktivierung bestimmter zur Abwehr benötigter Gene hervor (Ward et al., 1991). Darunter befinden sich auch die so genannten PR (pathogenesis-related) Gene (Van Loon und Van Strien, 1999). Einige der PR Proteine besitzen antimikrobielle Aktivität. Ist der SA Weg gestört, kann die Aktivierung dieser Gene nicht erfolgen. Der SA-Weg besteht insgesamt aus drei Teilen: der SA Biosynthese, der SA-Akkumulation und der SA-Signaltransduktion (Lu, 2009). Die SA Biosynthese ist nicht vollständig bekannt, allerdings weiß man von einem *SID2* (*SA INDUCTION DEFICIENT 2* auch bekannt als *ISOCHORISMATE SYNTHASE1*) abhängigen und einem *SID2* unabhängigen Biosyntheseweg (Lu, 2009). Da SA eine aromatische Verbindung ist, wird bei pathogeninduzierter SA Biosynthese Chorismat aus dem Shikimatweg von *SID2* zu Isochorismat umgesetzt. *sid2* Mutanten zeigen reduzierte SA Akkumulation und dadurch bedingt eine erhöhte Pathogenanfälligkeit (Lu, 2009; Nawrath und Métraux, 1999; Wildermuth et al., 2001).

Die SA Akkumulation ist ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt, viele Faktoren spielen hier eine Rolle. Klar ist, dass EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1) einen zentralen Stellenwert einnimmt (Wiermer et al., 2005). EDS1 ist wahrscheinlich eine Lipase die Resistenzen gegen Pathogene vermittelt (Aarts et al., 1998; Parker et al., 1996) und deren Signale wahrscheinlich über das lipaseähnliche Protein PAD4 (PHYTOALEXIN-DEFICIENT4) bzw. alternativ über

Einleitung

SAG101 (SENESCENCE ASSOCIATED GENE101) weitergeleitet werden (Lu, 2009). Sowohl EDS1 und PAD4 als auch SAG101 sind positive Regulatoren der SA-Signaltransduktion (Lu, 2009).

Die eigentliche Signaltransduktion des SA Signals kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, von denen noch nicht alle bekannt sind. Einer der gut untersuchten Signalwege benötigt *NPR1* (*NONEXPRESSOR OF PR GENES1* auch bekannt als *NIMI*). Die *npr1* Mutante akkumuliert SA nach Pathogenbefall in normaler Konzentration, kann aber die *PR* Gene nicht auf dem Level des WT exprimieren und die SAR nicht ausbilden (Pieterse und Van Loon, 2004). *NPR1* interagiert mit den hierarchisch unterhalb gelegenen Proteinen der NIMIN (*NIM1-INTERACTING1*), TGA und WRKY Familien, welche dann wiederum Abwehrgene beeinflussen (Lu, 2009).

Der SA Signalweg überschneidet sich bei der Pathogenabwehr mit dem JA- und ET-Signalweg, wobei die finale Abwehrreaktion stark davon beeinflusst wird in welcher zeitlichen Abfolge und Zusammensetzung die drei Hormone ausgeschüttet werden (Leon-Reyes et al., 2009). So kann z.B. die *PR1* Genexpression, die SA induzierbar ist dosisabhängig durch zusätzliches Ethylen verstärkt werden (De Vos et al., 2006).

Speziell die teilweise antagonistische teilweise synergetische Wirkung von SA und JA war Gegenstand vieler Untersuchungen. Viele Studien der Pathogenabwehr zeigen, dass endogen akkumulierendes SA antagonistisch auf JA-abhängige Signale wirkt, wobei SA abhängige Abwehrreaktionen Priorität über JA-Abwehrmechanismen haben, wofür *NPR1* essentiell ist (Koorneef und Pieterse, 2008; Spoel und Dong, 2008). Allerdings kann beim Zusammentreffen verschiedener Angreifer zur selben Zeit der JA-Signalweg dann Priorität über den SA Weg gewinnen, wenn JA zusammen mit ET induziert wird (Leon-Reyes et al., 2009). Physiologisch haben solche Kreuzreaktionen den Sinn ein flexibles System zu schaffen, dass es der Pflanze ermöglicht auf wechselnde Bedingungen oder Angreifer zu reagieren und dabei Energie und Ressourcen zu schonen. Dass solche Überschneidungen der Hormonnetzwerke auch für abiotische Stressreaktionen zutreffend sein können ist wahrscheinlich, da SA beispielsweise an Prozessen wie Hitzetoleranz mit ET zusammenwirkt (Larkindale und Knight, 2002). Solche Zusammenspiele von Signalmolekülnetzwerken sind daher auch für die Regulation der Eisenhomöostase in Pflanzen denkbar und könnten dort auch als Langstreckensignale fungieren.

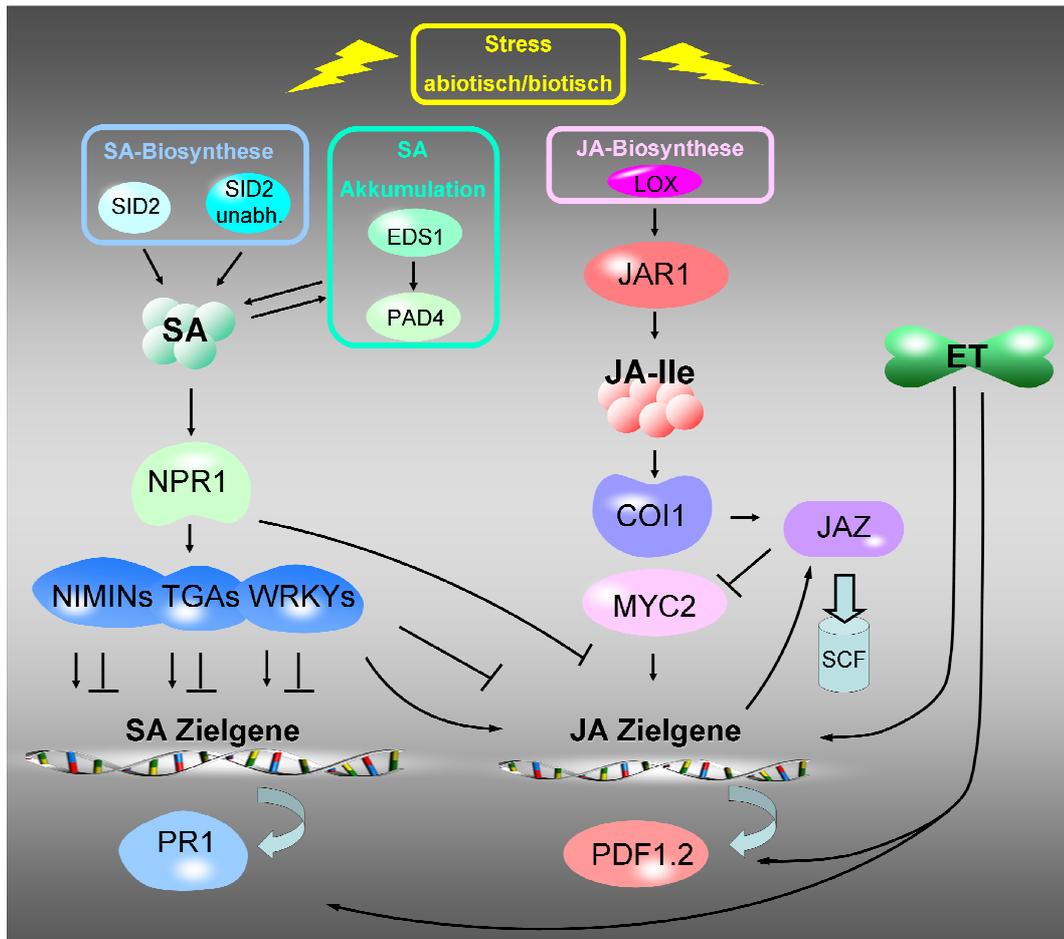


Abb. 3: Modell des Stressnetzwerks der Phytohormone SA, JA und ET in *Arabidopsis thaliana*

Abiotische und biotische Stressfaktoren können zur Biosynthese der Phytohormone SA, JA und Ethylen führen (**SA**) SA wird über SID2 oder SID2 unabhängige Wege gebildet. EDS1 und PAD4 sind zur SA Akkumulation notwendig und funktionieren als positive Regulatoren. Das Phytohormon SA induziert die Zielgene wie *PR1* über NPR1 und Regulatoren der NIMIN, TGA und WRKY Familien, die auch Einfluss auf JA abhängige Zielgene haben. (**JA**) Die JA Biosynthese läuft über Lipoxygenasen ab, das aktive JA-Ile wird über JAR1 gebildet und führt zum COI1-SCF vermittelten Abbau der negativen JAZ Regulatoren. Dadurch wird die Repression von MYC2 aufgehoben und JA Zielgene wie *PDF1.2* werden transkribiert. Die Zielgene aktivieren häufig wieder JAZ um die negative Regulation wiederherzustellen. (**ET**) Ethylen kann JA Zielgenen Priorität über SA Antworten vermitteln, wenn JA und ET gemeinsam auftreten. Auch *PDF1.2* ist ethylenabhängig reguliert, erreicht aber sein Transkriptionsmaximum bei gemeinsamem Auftreten von JA und ET. Ebenso wird die *PR1* Expression dosisabhängig von ET verstärkt. (Das Modell ist eine modifizierte Darstellung von Lu, 2009; Wasternack, 2007; Leon-Reyes et al., 2009 und Chini et al., 2009.)

3.3.3 Jasmonat

Jasmonat ist ein lipidbasierendes Hormon, das in Pflanzen zahlreiche Derivate besitzt, wie z.B. Methyljasmonat (MeJA). Die Jasmonate sind Mitglieder der Oxylipinfamilie, die in Pflanzen als biotische und abiotische Stresssignale agieren und auch Einfluss auf Wachstum und Entwicklung haben (Wasternack, 2007).

Der erste Schritt der JA Biosynthese startet mit einer Umsetzung der dreifach ungesättigten α -Linolensäure aus der Chloroplastenmembran durch Lipoxygenasen (LOX) und endet in den Peroxisomen mit der Bildung von (+)-7-iso-JA (Wasternack, 2007; Fonseca et al., 2009). Da dieses Molekül sehr instabil ist, wird es schnell zum stabileren (-)-JA umgesetzt, das allgemein als Jasmonat bekannt ist. Dieses wird in eine Vielzahl biologisch aktiver Derivate umgesetzt (Fonseca et al., 2009). Bei der Derivatisierung spielt speziell die Konjugation von JA mit Aminosäuren eine Rolle, die durch die Jasmonataminosynthetase JAR1 (JASMONATE RESISTANT1) umgesetzt wird und für die Wirksamkeit des Hormons notwendig ist (Fonseca et al., 2009). Das Derivat JA-L-Ile wird allgemein als die molekular wirksame Form des Signalmoleküls beschrieben (Fonseca et al., 2009).

Jasmonate spielen eine Rolle in vielen Entwicklungsprozessen wie Wurzelwachstum, Fruchtreifung, Seneszenz und Fertilität, vermitteln aber auch Stressantworten (Fonseca et al., Solano, 2009; Browse, 2009). Die von JA beeinflussten abiotischen Stressantworten umfassen unter anderem Anpassungen an Trockenheit, UV-Strahlung und Ozon (Browse, 2009). Bei Anpassungen auf biotische Stressfaktoren wie nekrotrophe Pathogene oder Insektenbefall wirken Jasmonate im Abwehrnetzwerk häufig synergetisch mit ET und antagonistisch zu SA (Reymond und Farmer, 1998; Farmer et al., 2003; Leon-Reyes et al., 2009; Leon-Reyes et al., 2010).

Speziell bei der induzierten systemischen Resistenz (ISR) spielen JA und ET regulierte Signalwege eine wichtige Rolle. Die ISR wird typischerweise durch nicht pathogene Rhizobakterien an den Wurzeln der Pflanze ausgelöst (Pieterse et al., 2009). Durch JA und ET regulierte Signalwege werden dann Langstreckensignale durch die Vaskulatur in die überirdischen Pflanzenteile ausgesandt und führen zur Ausbildung systemischer Immunität in der ganzen Pflanze (Pieterse et al., 2009). Vergleichbare Abwehrreaktionen wie im Fall der SAR (siehe 3.3.2) werden aber erst dann aktiv, wenn die Pflanze danach tatsächlich von einem Pathogen angegriffen wird (Pieterse et al., 2009). Die ISR verleiht

Einleitung

vielen Pflanzenspezies Immunität gegen eine Vielzahl von Oomyceten, Pilzen, Bakterien, Viren und herbivoren Insekten (Pozo et al., 2008).

Den ersten physiologischen Effekt der Jasmonate entdeckte man 1981 (Dathe et al.) mit der Beobachtung, dass das Wurzelwachstum von Keimlingen unter dem Einfluss von Jasmonat stark inhibiert war. Daher können jasmonatinsensitive Mutanten wie z.B. *jar1-1* und *coi1-1* (*coronatine insensitive1-1*) dadurch identifiziert werden, dass sie bei Jasmonatbehandlung Wurzelwachstum zeigen, das mit unbehandelten WT Pflanzen vergleichbar ist (Feys et al., 1994). Die *coi1-1* Mutante zeigt männliche Sterilität und Defekte in der Aktivierung JA abhängiger Gene (Feys et al., 1994).

COI1 ist ein für den JA Signalweg essentielles F-Box Protein das mit 4 weiteren Interaktionspartnern den sogenannten SCF-COI1 (SKIP-CULLIN-F-box) Komplex bildet, der als E3 Ubiquitinligase agiert (Yan et al., 2009). Diese JA abhängige E3 Ubiquitinligase markiert negative JA Regulatoren, JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN) Gene genannt, zum Abbau durch den 26S Proteasom (Fonseca et al., 2009). Diese entlassen nach ihrer Degradation MYC2/JIN1 einen bHLH Transkriptionsaktivator der dann an Promotoren JA regulierter Gene die Transkription in Gang setzen kann (Fonseca et al., 2009). Die Zielgene aktivieren zur Wiederherstellung der negativen Regulation häufig die JAZ Regulatoren (Wasternack, 2007). Ein klassisches JA Markergen ist das *PLANT DEFENSIN1.2* (*PDF1.2*). Die Regulation dieses Gens wird durch JA, ET und SA beeinflusst (Wasternack, 2007). *PDF1.2* wird JA und ET abhängig induziert und bei Kombination beider Hormone zeigt es seine stärkste Expression (Penninckx et al., 1998). SA induzierte Gene wie der Transkriptionsfaktor *WRKY70* dagegen haben negative oder im Fall der der Transkriptionsfaktoren *TGA2,5,6* positive Wirkung auf die Expression des Gens (Wasternack, 2007).

3.4 Vorarbeiten

3.4.1 Effekte von Jasmonat auf die IRT1 Promotoraktivität (Maurer et al., 2011)

Diese Vorarbeiten (Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2) wurden von Sabine Müller im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Bauer durchgeführt.

Um zu testen ob Jasmonat die Eisenaufnahme beeinflusst und damit ein Kandidat für ein systemisches Eisensignal in Pflanzen darstellt, wurde die Wirkung des Phytohormons auf die Regulation von Eisenaufnahmegenen getestet. *pIRT1::GUS* Tests zeigten einen Rückgang der *IRT1* Promotoraktivität unter Einfluss von Jasmonat, unabhängig von der Eisenversorgung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass JA die Gene der Eisenmangelantwort negativ beeinflussen kann.

3.4.2 Auswirkungen des Lipoxygenaseinhibitors Ibuprofen auf die Eisenmangelantwort (Maurer et al., 2011)

In früheren Experimenten (Wang et al., 2007; Vert, Briat und Curie, 2003) konnte gezeigt werden, dass im Wurzeltrennungssystem (siehe Material und Methoden) die Induktion von *FRO2* und *IRT1* in der –Fe Wurzelhälfte unterdrückt wurde. Dieser inhibitorische Effekt geht möglicherweise auf ein systemisches Signal zurück, bei dem es sich um Jasmonat handeln könnte. Zuerst wurden in Vorversuchen der inhibitorische Effekt in der –Fe Wurzelhälfte im Wurzeltrennungssystem bestätigt. Darüber hinaus zeigen Ergebnisse von Vorversuche mit Ibuprofen, einem Inhibitor der Lipoxygenasen die zur Jasmonatbiosynthese benötigt werden (Staswick et al., 1991; Zhuet al., 2006), einen generellen Anstieg der Expressionslevels der Eisenaufnahmegene und geben damit einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei dem inhibitorischen Signal um Jasmonat handeln könnte.

Diese Vorergebnisse wurden als Basis genutzt um detailliertere Genexpressionsanalysen im Wurzeltrennungssystem mit JA Mutanten und Eisenhomöostasemutanten durchzuführen.

3.4.3 Kreuzung von bHLH Einzelmutanten zur Kultivierung von homozygoten bHLH Mehrfachmutanten

Um die Funktionen der Untergruppe Ib(2) bHLH Transkriptionsfaktoren zu untersuchen wurde aufgrund der vermuteten Redundanz der Gene die Kreuzung einer möglichst hochgradigen Mutante angestrebt. Da *BHLH38* und *BHLH39* vermutlich Ergebnis einer Tandemduplikation sind, liegen sie auf Chromosom 3 in Tandem zusammen, so dass ein Crossing-over zwischen den Genen sehr unwahrscheinlich ist (Vorwieger et al., 2007). Das heißt, die Kreuzung von *BHLH38* und *BHLH39* Einzelmutanten zu einer *BHLH38/BHLH39* Doppelmutante zur Generierung von Drei- oder Vierfachmutanten wäre aufgrund der Vielzahl von zu untersuchenden Pflanzen ein sehr langwieriges Projekt. Die Dreifachmutanten, die durch Kreuzung innerhalb weniger Generationen gezüchtet werden können, sind Dreifachmutanten mit entweder *BHLH38* oder *BHLH39* als letztem aktivem Gen der Untergruppe Ib(2). Da für *BHLH39* Funktionen in der Regulation von *IRT1* vermutet werden, die für *BHLH38* nicht gezeigt werden konnten (Yuan et al., 2008), wurden deshalb im Vorfeld dieser Arbeit mögliche Dreifachmutanten durch Kreuzen der homozygoten T-DNA Einzelmutanten *bHLH039-1*, *bHLH100-1* und *bHLH101-1* erzeugt (Prof. Dr. Petra Bauer, nicht veröffentlicht), um nur die putativ geringeren Funktionen von *bHLH38* in der Pflanze aktiv zu belassen. Das bereits erstellte Saatgut wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Ziel genotypisiert, eine *BHLH039/BHLH100/BHLH101* Dreifachmutante zu finden und diese als Ausgangspunkt für weitere Arbeiten zu nutzen.

4. Ziele dieser Arbeit

bHLH Transkriptionsfaktoren übernehmen eine Vielzahl wichtiger regulatorischer Aufgaben in Eukaryoten und besitzen durch ihre Fähigkeit mit anderen bHLH Proteinen Dimere zu bilden ein breites Spektrum an Funktionen. Speziell in der Eisenaufnahme von Pflanzen nehmen bHLH Transkriptionsfaktoren wie AtFIT eine zentrale Rolle in der Regulation der Eisenaufnahme ein. Da die vier bHLH Proteine der Untergruppe Ib(2) in *Arabidopsis* durch Eisenmangel in Blättern und Wurzeln induziert werden, allerdings nur zwei von ihnen in Wurzeln mit dem zentralen Regulator AtFIT interagieren um Gene der Eisenaufnahme zu induzieren, ist es wahrscheinlich, dass sie weitere Gene im Zusammenhang der Eisenhomöostase unabhängig von FIT regulieren. Da sie bei Eisenmangel nicht nur im Wurzel- sondern auch im Blattgewebe aktiv sind, wäre es möglich, dass diese Transkriptionsfaktoren Langstreckensignale der Eisenhomöostase verarbeiten. Daher ist es zum Verständnis der Eisenhomöostase notwendig die Funktionen dieser Gengruppe zu erforschen. Ein Ziel dieses Projekts war es daher Funktionen der vier bHLH Ib(2) Proteine in der Regulation der Eisenaufnahme und der Eisenhomöostase von *Arabidopsis thaliana* zu finden.

Eine weitere Fragestellung des Projekts ist, durch welche Mechanismen Eisenmangel oder ausreichende Eisenversorgung zur Induktion bzw. Repression von Transkriptionsfaktoren der Eisenhomöostase wie z.B. FIT oder der Ib(2) bHLHs und der Gene der Eisenaufnahme führt. Obwohl die Eisenaufnahme in Pflanzen seit Jahrzehnten wissenschaftlich untersucht wird, ist es bisher nicht gelungen, genau zu ergründen welche Signale Eisenmangel bzw. ausreichende Eisenversorgung in der Pflanze anzeigen. Daher wurde in diesem Projekt getestet, ob die Phytohormone Salizylat und Jasmonat, die als systemische Langstreckensignale in Abwehr- und Stressreaktionen agieren und Einfluss auf die Transkription zweier Ib(2) bHLH Transkriptionsfaktoren haben, die Eisenmangelantwort beeinflussen.

Die konkreten Ziele dieser Arbeit lauten daher:

4.1 Verifikation und detaillierte Charakterisierung einer bHLH Dreifachmutante zur Untersuchung der Genfunktionen in *Arabidopsis thaliana*

Um die Funktionen der vier Untergruppe Ib(2) bHLH Transkriptionsfaktoren untersuchen zu können mussten homozygote *BHLH39/100/101* dreifach KO Mutanten

aus segregierenden Dreifachmutantenlinien gefunden werden. Genexpressionsstudien sollten durchgeführt werden, um den vollständigen Knock out der Gene auf Transkriptebene zu überprüfen. Als nächstes sollte eine selektierte *BHLH39/100/101* dreifach KO Mutante detaillierten physiologischen Analysen im Vergleich zum WT unterzogen werden. Mit Metallgehaltmessungen und molekularbiologischen Methoden wie Genexpressionsstudien von Eisenmarkergenen sowie Eisenreduktaseaktivitätsmessungen sollte überprüft werden, ob das Fehlen der bHLH Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Eisenaufnahmeregulation in der Wurzel und die Eisenhomöostase in Blättern hat. Die Analysen sollten zudem zeigen, ob die bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren ähnliche Funktionen besitzen und das Vorhandensein von bHLH38 bei Eisenmangel zur Erhaltung der Eisenhomöostase ausreichend ist.

Um die Funktionen der bHLH Ib(2) Gene in einem weiteren Kontext betrachten zu können und die gewonnenen Expressionsdaten zu bestätigen, sollten die Transkriptome der *BHLH39/100/101* dreifach KO Mutante und des WT in einem Genexpressionsmikroarray verglichen werden. In der Genexpressionsstudie wurde die Mutante dem WT bei Eisenmangel gegenübergestellt. Dabei sollten differentiell exprimierte Gene gefunden werden, die im Zusammenhang der Eisenhomöostase stehen und mögliche Ziele der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren darstellen, die deren Funktionen erklären.

4.2 Untersuchung des Einflusses von Salizylat auf die Eisenhomöostase im WT, der *3xbhlh* Mutante und in SA-Netzwerkmutanten

Da *BHLH38/39* Ziele des salizylsäureinduzierbaren Transkriptionsfaktors OBP3 sind und selbst durch Salizylat induziert werden können, sollte überprüft werden ob die Eisenmangelantwort im WT durch Salizylat positiv beeinflusst wird. Mit den SA-Netzwerkmutanten *npr1*, *NahG* und *sid2* sollten diese Ergebnisse im Mutantenhintergrund bestätigt werden. Im Vergleich dazu sollte in der *3xbhlh* Mutante ebenfalls der Einfluss von Salizylat auf die Eisenaufnahme getestet werden, um zu überprüfen ob das Fehlen der bHLHs in der Mutante zu Unterschieden in der Regulation von Eisenmarkergenen als Antwort auf die Salizylatbehandlung führt. Die Untersuchungen sollten zeigen ob SA als Eisensignal in Arabidopsis fungiert und ob *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* dazu notwendig sind. Zur Untersuchung der bHLH Ib(2) Funktionen im physiologischen Zusammenhang des Salizylatstressnetzwerks sollten in dem zuvor beschriebenen Genexpressionsmikroarray außerdem die

Transkriptome von WT und *3xbhlh* bei Eisenmangel unter Einfluss von Salizylat miteinander verglichen werden. Die Genexpressionsanalyse sollte durch das Auffinden differentiell exprimierter Gene Aufschluss über die Funktionen der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren im Salizylatstressnetzwerk geben. Die identifizierten Gene sollten in dieser Analyse mit besonderem Augenmerk auf mögliche Zusammenhänge mit der Eisenhomöostase betrachtet werden.

4.3 Bestätigung und Untersuchung einer Überexpressionslinie zur individuellen Charakterisierung der Aufgaben des *BHLH39* in der Eisenhomöostase

BHLH39 sollte im Hinblick auf die Eisenhomöostase *in vivo* charakterisiert werden. Dazu wurde ein *3xHA-BHLH39* Überexpressionskonstrukt unter der Kontrolle von zwei CaMV 35S Promotoren erstellt (Dipl. Biol. Anna Kühn in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Johannes Meiser, unveröffentlichte Daten) und in Arabidopsispflanzen transformiert. Im Rahmen dieses Projekts sollten die Pflanzen bis zur Homozygotie in der dritten Generation selektiert und vermehrt werden. Anhand von Genexpressionsanalysen und Proteindetektierbarkeit sollte eine Linie ausgewählt werden. Die Überexpressionslinie sollte anschließend molekularphysiologischen Analysen im Vergleich zum WT unterzogen werden. Mit Metallgehaltsmessungen Genexpressionsstudien von Eisenmarkergenen sowie Eisenreduktaseaktivitätsmessungen sollte gezeigt werden ob die *BHLH39* Überexpression zu einer veränderten Transkription und Aktivität von Eisenhomöostasegenen führt.

4.4 Untersuchung der posttranslationalen Regulation von bHLH39 bei Eisenmangel und durch hormonelle Signale

Um zu verstehen wie die posttranslationale Regulation von bHLH39 abläuft und dadurch die Regulation der Eisenmangelantwort beeinflusst, sollten Proteinregulationsexperimente unter ausreichender Eisenversorgung und Eisenmangel durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob die Überexpression von *BHLH39* zu einer konstanten Anwesenheit des Proteins führt und ob die Translation eisenabhängig ist. Außerdem sollte das Protein in Abhängigkeit der Eisenversorgung untersucht werden.

Zur Erforschung hormoneller Signale, die die Eisenmangelantwort modulieren, sollte der Einfluss von Ethylen und Salizylat bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung auf die Regulation des bHLH39 Proteins untersucht werden. Da gezeigt wurde, dass

Ethylen und Ethylenvorläufer wie Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) die FIT Stabilität beeinflussen (Lingam et al., 2011), sollte getestet werden ob Ethylenvorläufer oder Ethylensyntheseinhibitoren abhängig vom Eisenstatus Einfluss auf das bHLH39 Protein haben. Gleiches sollte für Salizylat, dessen induzierende Wirkung auf bHLH38/39 bisher nur für deren Transkripte gezeigt wurde, getestet werden. Diese Experimente sollten zeigen ob Ethylen oder Salizylat das bHLH39 Protein beeinflussen und ob über eine solche Wirkung auf bHLH39 prinzipiell die Eisenmangelantwort beeinflusst werden könnte.

4.5 Untersuchung der Rolle des Phytohormons Jasmonat in der Regulation der Eisenaufnahmemaschinerie

In Vorexperimenten mit *pIRT1::GUS* Pflanzen war bei Eisenmangel unter Einfluss von Jasmonat ein Rückgang der Promotoraktivität zu beobachten. Um zu testen ob Jasmonat die Eisenaufnahme generell negativ beeinflusst und damit ein Kandidat für ein systemisches Eisensignal für ausreichende Eisenversorgung in Pflanzen darstellt, sollte der Effekt des Phytohormons und seines Inhibitors Ibuprofen auf die Expression der zentralen Gene der Eisenaufnahme untersucht werden. Die Versuche sollten zeigen ob neben *IRT1* auch die Expression weiterer Gene der Eisenmangelantwort durch Jasmonat reprimiert wird und ob Ibuprofen diesen Effekt verhindern kann. Versuche mit den KO Mutanten *fit* und *jar1-1* sollten weiterhin Aufschluss darüber geben ob die erwartete Jasmonatwirkung auch auftreten kann wenn die Eisenmangelantwort bzw. Teile des Jasmonatsignalwegs gestört sind. Mit Analysen im Wurzeltrennungssystem sollte schließlich gezeigt werden, ob das Signal für ausreichende Eisenversorgung, welches die Gene der Eisenaufnahme im WT herunter reguliert, durch Ibuprofen unterbunden werden kann, bzw. in der jasmonatinsensitiven Mutante *coi1-1* überhaupt stattfindet. Die Wurzeltrennungsanalysen sollten bestätigen, ob es sich bei Jasmonat um ein systemisches Pflanzensignal handelt, dass die Eisenmangelantwort bei ausreichender Eisenversorgung unterdrückt.

5. Material und Methoden

5.1 Material

Allgemeine Laboreinrichtungen, verwendete Maschinen, Arbeitsgeräte und Chemikalien entsprachen den in der Molekularbiologie üblichen Anforderungen und sind hier nicht gesondert aufgeführt. Im Folgenden sind die speziellen Materialien aufgelistet, welche für die Durchführung der Arbeit im Speziellen wesentlich waren.

5.1.1 Pflanzen

- *Arabidopsis thaliana* Ekotyp Columbia (Col-0) wurde als Wildtyp verwendet, Saatgutnummer P132 (AG Prof. Dr. Petra Bauer)
- **pIRT1::GUS** Samen wurden von C.Curie zur Verfügung gestellt (Vert et al., 2002).
- **coi1-1** Samen wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer NASC N9721 bestellt. Die Mutante enthält im *COI1* Gen einen G zu A Basenaustausch an der Position 1401 vom Startcodon aus, der zu dem Stopcodon W497STOP führt. Der Phänotyp wurde über einen *in vitro* Jasmonat-Wurzelwachstumsassay verifiziert (Staswick et al., 2002).
- **jar1-1** Samen wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer NASC N8072 bestellt. Die Mutation ist EMS basierend und beruht auf einem Phenylalanin zu Serin-101 Austausch im JAR1 Protein. Der Phänotyp wurde über einen *in vitro* Jasmonat-Wurzelwachstumsassay verifiziert (Staswick et al., 2002).
- **3xHA-BHLH39** Überexpressionspflanzen der Linien JM73-5, JM75-6, JM77-10 und JM78-5 wurden von Dr. Johannes Meiser und Dipl. Biol. Anna Kühn in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Bauer kultiviert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Zur Erstellung des Konstrukts wurde *BHLH39* cDNA mittels Gatewayklonierung in den pALLIGATOR2 Vektor (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/jg/alligator/vectors.html>) integriert.
- **npr1-1** homozygote KO Mutanten wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer N3726 bestellt (Cao et al., 1997). Die Mutation ist EMS basierend. Der Phänotyp wurde über die fehlende *PR1* Expression als Antwort auf

Salizylatbehandlung (5.2.5) in 6 Tage alten Pflanzen im Vergleich zum WT verifiziert.

- *nahG* KO Mutanten wurden von F. Ausubel zu Verfügung gestellt. Der Phänotyp wurde über die fehlende *PR1* Expression als Antwort auf Salizylatbehandlung (5.2.5) in 6 Tage alten Pflanzen im Vergleich zum WT verifiziert (Ferrari et al., 2003).
- *sid2-2* KO Mutanten wurden von F. Ausubel zu Verfügung gestellt (Ferrari et al., 2003).

5.1.1.1 Arabidopsis T-DNA Insertionslinien:

- *bHLH038-1* KO Mutanten wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer SALK_020183 bestellt. Homozygote T-DNA Insertionspflanzen wurden per genomischer PCR verifiziert.
- *bHLH039-1* KO Mutanten wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer SALK_025676 bestellt. Homozygote T-DNA Insertionspflanzen wurden per genomischer PCR verifiziert.
- *bHLH0100-1* KO Mutanten wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer SALK_074568 bestellt. Homozygote T-DNA Insertionspflanzen wurden per genomischer PCR verifiziert.
- *bHLH0101-1* KO Mutanten wurden im European Arabidopsis Stock Centre unter der Nummer SALK_011245 bestellt. Homozygote T-DNA Insertionspflanzen wurden per genomischer PCR verifiziert.
- *fit-3* (GK-108C10-012313) KO Mutanten, in dieser Arbeit *fit* benannt, wurden über ihre starke Blattchlorose verifiziert (Jakoby et al., 2004).

5.1.2 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Gatewayvektoren ohne Insertion:

- *E. coli*, ccdB one shot survival T1-Phage resistente Zellen (Invitrogen)
F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 ara 139 D (ara- leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG tonA::Ptrc -ccdA

Zur Vermehrung von Gatewayvektoren mit Insertion:

- *E. coli* INV α F' (Invitrogen) F' endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ϕ 80lacZ_M15_(lacZYAargF) U169 λ - *Agrobacterium tumefaciens*: C58C1; GV2260/pGV2260

Zur stabilen Transformation von Arabidopsispflanzen:

- *Agrobacterium tumefaciens*: C58C1; GV2260/pGV2260

5.1.3 Vektoren

- **Gatewayfähige Vektoren zur Erstellung von Eintritts- und Zielvektorkonstrukten:**

Detaillierte Informationen über gatewaykompatible Vektoren sind unter folgender Adresse im Internet zugänglich:

http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html

pDONR207 (Gatewayklonierungssystem, Invitrogen):

- Größe: 5,5 kb
- Gatewayeintrittsvektor mit Gatewaykassette und P1 bzw. P2 Verbindungsstellen
- Insertionskontrolle: *ccdb* Selbstmordgen
- Transformationskontrolle in Bakterien: Gm^R

pALLIGATOR2

- Größe: 11 kb
- binärer Gatewayzielvektor mit Gatewaykassette und B1 bzw. B2 Verbindungsstellen
- Insertionskontrolle: *ccdb* Selbstmordgen
- Transformationskontrolle in Bakterien: Spc^R
- Transformationskontrolle in Pflanzen: GFP Fluoreszenz unter Kontrolle des samenspezifischen Promotors At2s3

pMDC32 (Curtis und Grossniklaus, 2003)

- Größe: 11,7 kb
- binärer Gatewayzielvektor mit Gatewaykassette und B1 bzw. B2 Verbindungsstellen
- Insertionskontrolle: *ccdb* Selbstmordgen
- Transformationskontrolle in Bakterien: Kan^R
- Transformationskontrolle in Pflanzen: Hygromycin^R

pAGRIKOLA-CATMA3a49950

- Größe: 9,5 kb
- binärer Gateway hairpin RNA Vektor mit Gatewaykassette und B1 bzw. B2 Verbindungsstellen
- bereits bei Lieferung mit *BHLH38* spezifischer hairpin RNA (188bp)
- Transformationskontrolle in Bakterien: Neo^R, Kan^R
- Transformationskontrolle in Pflanzen: Basta^R
- erworben über BCCM/LMBP
- weitere Informationen unter:
http://www.catma.org/database/simple.php?catma_id=CATMA3a49950

- **nicht-gatewayfähige Vektoren als Template zur Herstellung spezifischer hairpin RNA Vektoren:**

pRS300

- Größe: 3,3 kb
- hairpin RNA Vektor bereits bei Lieferung mit MIR319a spezifischer hairpin RNA (404bp)
- Transformationskontrolle in Bakterien: Amp^R
- erworben über Prof. Detlef Weigel (weigel@tuebingen.mpg.de)
- weitere Informationen unter: <http://www.addgene.org/22846/>

5.1.4 Oligonukleotide

5.1.4.1 Genotypisierungsprimer

Gen/T-DNA	Primer Name	Sequenz
<i>BHLH38</i> (At3g56970)	BHLH38 LP	5'-AGACACAAATGGGATCAAGTTG-3'
	BHLH38 RP	5'-AAGGGTTAACTCGGTGTTCTTC-3'
<i>BHLH39</i> (At3g56980)	BHLH39 LP	5'-GGAGGTCAACAAATAAATAAAATGC-3'
	BHLH39 RP	5'-ACTTCAAGCTTCGAGAAACCG-3'
<i>BHLH100</i> (At2g41240)	BHLH100 LP	5'-TTGTGGTAGAAAAATGTAATTGC-3'
	BHLH100 RP	5'-TCAGTTTATGTTACTTGGGACCG-3'
<i>BHLH101</i> (At5g04150)	BHLH101 LP	5'-TATGATTGGCGTAATCCCAAG-3'
	BHLH101 RP	5'-TTTCTACTTCATCCCATCAAAG-3'
SALK T-DNA	Salk LBb1	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'
HA-Tag	attB1-HA3	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTCCATGGCATACCCATACGACGT-3'

5.1.4.2 Primer für quantitative Real Time Reverse Transkriptase PCR

Gen (AGI Code)	Primer Name	Sequenz
<i>BHLH38</i> (At3g56970)	bHLH038F	5'-AGCAGCAACCAAAGGCG-3'
	bHLH038R	5'- CCACTTGAAGATGCAAAGTGTAG- 3'
<i>BHLH39</i> (At3g56980)	bHLH039F	5'-GACGGTTTCTCGAAGCTTG-3'
	bHLH039R	5'-GGTGGCTGCTTAACGTAACAT-3'
<i>BHLH100</i> (At2g41240)	bHLH100F	5'-AAGTCAGAGGAAGGGGTTACA- 3'
	bHLH100R	5'- GATGCATAGAGTAAAAGAGTCGCT -3'
<i>BHLH101</i> (At5g04150)	bHLH101F	5'-CAGCTGAGAAACAAAGCAATG-
	bHLH101R	5'-CAGTCTCACTTTGCAATCTCC-3'

Material und Methoden

<i>FIT</i> (At2g28160)	AtFRU-c-5' (1392) AtFRU-c-3' (1483)	5'-GGAGAAGGTGTTGCTCCATC-3' 5'-TCCGGAGAAGGAGAGCTTAG-3'
<i>FRO2</i> (At1g01580)	AtFRO2-c-5' (1806) AtFRO2-c-3' (1927)	5'-CTTGGTCATCTCCGTGAGC-3' 5'-AAGATGTTGGAGATGGACGG-3'
<i>IRT1</i> (At4g19690)	AtIRT1-c-5' (1523) AtIRT1-c-3' (1622)	5'-AAGCTTTGATCACGGTTGG-3' 5'-TTAGGTCCCATGAACTCCG-3'
<i>EF1B-alpha</i> für genomische DNA (At5g19510)	AtEF-gen-5' (2522) AtEF-gen 3' (2726)	5'-TCCGAACAATACCAGAACTACG- 5'-CCGGGACATATGGAGGTAAG-3'
<i>EF1B-alpha</i> für cDNA (At5g19510)	AtEF-c-5' (2125) AtEF-c-3' (2251)	5'-ACTTGTACCAGTTGGTTATGGG- 5'-CTGGATGTACTCGTTGTTAGGC-
<i>UBP6</i> (At1g51710)	AtUBP6-c-5' (975) AtUBP6-c-3' (1066)	5'-GAAAGTGGATTACCCGCTG-3' 5'-CTCTAAGTTTCTGGCGAGGAG-3'
<i>YSL1</i> (AT4G24120)	YSL1-RT-(2429)-5' YSL1-RT-(2552)-3'	5'-TTTAGCTTCATAGGA TCAGTCAA-3' 5'-GTCTTGTTTCAGAAGT CTACCTGTT-3'
<i>FER1</i> (AT5G01600)	5'RT FER1 3'RT FER1	5'-ACGCACTCTCGTCTTTCACC-3' 5'-GAAAGGCTGGAACACGACTC-3'
<i>PR1</i> (AT2G14610) Standard Amplifikation	Std 5'-PR-1 (76) Std 3'-PR-1 (610)	5'-AGCTCTTGTTAGGTGCTCTTG-3' 5'-ACATCCTGCATATGATGCTC-3'
<i>PR1</i> (AT2G14610)	qRT-PCR 5'PR1 (379) qRT-PCR 3'PR1 (483)	5'-AAGTCAGTGAGACTCGGATG-3' 5'-GTATGGCTTCTCGTTCACAT-3'
<i>PDF1.2</i> (AT5G44420) Standard Amplifikation	Std 5'PDF1.2 (55) Std 3'PDF1.2 (510)	5'-AAGTTTGCTTCCATCATCAC-3' 5'-ATTGTAACAACAACGGGAAA-3'

Material und Methoden

<i>PDF1.2</i> (AT5G44420)	qRT-PCR 5'PDF1.2 (65)	5'-CCATCATCACCCCTTATCTTC-3'
	qRT-PCR 3'PDF1.2 (165)	5'-TGTCCCACTTGGCTTCT-3'
<i>OBP3</i> (AT3G55370)	OBP3-STD 5'	5'-ATCACCACCGACTTCTCAGG
Standard Amplifikation	OBP3-STD 3'	5'-AGATTGCACCAATCCGGTAG-3'
<i>OBP3</i> (AT3G55370)	OBP3-RT 5'	5'-TCGCCCAAGTTACTCAAACC-3'
	OBP3-RT 3'	5'-GCTGAGCTTGTGTGATGGA-3'

5.1.4.3 Primer zur Erstellung der *BHLH38* miRNA

Produkt	Primer Name	Sequenz
microRNA	I miR-s	5'-GATAGTTAAACGAGTTTTTCGCAT TCTCTCTTTTGTAT TCC -3'
	II miR-a	5'-GAATGCGAAAACCTCGTTTAACTA TCAAAGAGAATCAATGA-3'
microRNA*	III miR*s	5'-GAATACGAAAACCTCGATTAAC TT TCACAGGTCGTGATATG-3'
	IV miR*a	5'-GAAAGTTAATCGAGTTTTTCGTAT T TCTACATATATATTCCT-3'
attB1- miRNA- attB2	A	5'- GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3'
	B	5'- GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAG-3'

Rot markiert sind gewollte Mispaarungen mit der Komplementärsequenz. **Fett** markiert sind die Rekombinationssequenzen für das Gatewayklonierungssystem.

5.1.5 Antikörper

5.1.5.1 Anti-HA

- **Primärer Antikörper:**

Monoklonaler Ratten Anti-HA Antikörper, Klon 3F10, Roche

- **Sekundärer Antikörper:**

Anti-Ratte IgG Antikörper meerrettichperoxidasegekoppelt, Sigma-Aldrich

5.1.6 Enzyme und Kits

Anwendung	Name	Hersteller
Proteinquantifikation	2-D Quant Kit	Amersham
	Roti Quant universal	Roth
cDNA Synthese	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
DNase I Verdau	DNase I, RNase-free	Fermentas
RNA Isolation	Spectrum Plant Total RNA Kit	Sigma-Aldrich
(qRT-PCR)		
RNA Isolation	RNeasy Plant Mini Prep Kit	Qiagen
(Mikroarray)		
Standard PCR	JumpStartREDTaq Ready Mix	Sigma-Aldrich
Real time qRT-PCR	Premix ExTaq	TaKaRa
Klonierung	Phusion DNA Polymerase	Finnzymes
(Insert Amplifikation)		
BP Reaktion	Gateway BP clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
(Gateway Klonierung)		
LR Reaktion	Gateway LR clonase II Enzyme Mix	Invitrogen
(Gateway Klonierung)		

5.1.7 Geräte

Digitale Spiegelreflex Kamera	Canon
Pflanzenzuchtschrank	Percival CU 3624
Sterilbank für Pflanzenbiologie	Heraeus HeraSafe KS 12
UV-Plattenspektrophotometer	Tecan Safire2
Zentrifuge	Heraeus Multifuge
PCR Cycler	
real time qPCR Cycler	Bio-Rad MyIQ Cycler

5.1.8 Software

Bildbearbeitung	GIMP 2
Datenbank: http://www.arabidopsis.org	Tair
Erstellung von Diagrammen	Sigma Plot 11
Mikroarrayauswertung	NIA Array Analysis http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/
Micro RNA Design	WMD3, WEB MicroRNA Designer http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdmmd
Venn Plot Erstellung	Venn Selector http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_venn_selector.cgi
Textverarbeitung	Word, MS Office 2003
Erstellung von Modellen und Schaubildern	PowerPoint, MS Office 2003
Statistische Auswertung	http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm

5.1.9 Pflanzenmedien

Medium für Hoagland Agarplatten (1x Hoagland)

Makronährstoffe:

0,75 mM MgSO₄

0,5 mM KH₂PO₄

1,25 mM KNO₃

1,5 mM Ca(NO₃)₂

Mikronährstoffe

50 µM KCL

50 µM H₃BO₄

10 µM MnSO₄

2 µM ZnSO₄

1,5 µM CuSO₄

0,075 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄

Eisen:

10 µM FeNaEDTA

1,% Saccharose,

0,8% Pflanzenagar

Einstellung von pH 6,0 mit 0,1 M KOH und 0,1 M HCL

5.2 Methoden

5.2.1 Pflanzenbiologische Techniken

5.2.1.1 Pflanzenzucht

Samensterilisation

Zur sterilen Aufzucht der *Arabidopsis thaliana* Pflanzen im Pflanzenschrank wurden die Samen für 9 Minuten in 6%igem NaHOCl mit 0,1%igem Triton-X-100 sterilisiert. Die Samen wurden nach 4 Waschschritten mit aqua dest. in 0,5 ml 0,1 % Pflanzenagar aufgenommen und für 3 Tage zur Stratifikation bei -4°C gelagert.

Anzucht auf Agarplatten

Die bereits sterilisierten Samen wurden mit einer Pipette auf Agarplatten übertragen und mit einem zuvor abgeflammt Spatel gleichmäßig in 2 Reihen à 12 Samen verteilt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und vertikal zum Licht bei einer Lichtintensität von 72% (entspricht $150 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) und 21°C bzw. 19°C und 16 h Licht/8 h Dunkelheit (Langtagbedingungen) im Pflanzenzuchtschrank kultiviert.

Anzucht auf Erde

Die Erde besteht aus einem Gemisch von Vermikulit und Torferde im Verhältnis 1:3 (Klassmann Substrat 2). Das Substrat wurde über Nacht bei 80°C Hitze behandelt und in Plastiktöpfe gefüllt. Die Samen wurden mit einem Holzspieß auf die vorher befeuchtete Erde aufgetragen und zum Wachstum im Pflanzenanzuchtraum platziert.

5.2.1.2 Wurzeltrennungssystem

Für das Wurzeltrennungssystem wurden die Pflanzen für 14d auf Hoaglandagarmedium mit $100 \mu\text{M}$ FeNaEDTA kultiviert und dann die Wurzel 2 cm unter dem Hypokotyl entfernt. Zwei Wochen später wurden die Pflanzen auf dreigeteilte Petrischalen transferiert und die Wurzeln dabei auf zwei Kammern aufgeteilt, während der Spross in der dritten Kammer platziert wurde. Die Kammern mit den Wurzeln enthielten Hoaglandagarmedium mit entweder $100 \mu\text{M}$ Fe/ $100 \mu\text{M}$ Fe (+/+), $0 \mu\text{M}$ Fe/ $0 \mu\text{M}$ Fe (-/-) oder $100 \mu\text{M}$ / $0 \mu\text{M}$ (+/ für die $100 \mu\text{M}$ Seite; -/ für die $0 \mu\text{M}$ Seite). Das eisenarme $0 \mu\text{M}$ Fe Medium enthielt zusätzlich immer $50 \mu\text{M}$ Ferrozin um Spuren von Eisen zu komplexieren. Nach drei Tagen wurden die Pflanzen analysiert

5.2.2 RNA Analysen

5.2.2.1 Quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Momentan ist eine der genauesten Methoden zum Ermitteln der Genexpression die quantitative Real-Time Reverse Transkriptase PCR. Theoretisch ist es damit möglich sogar ein einziges Transkript nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden die Expressionsanalysen in Übereinstimmung mit dem Protokoll für quantitative qRT-PCR durchgeführt (Klatte und Bauer, 2008). Es handelt sich hier um eine Real-Time qPCR Methode die SYBR green zur Detektion verwendet.

Primererstellung

Zur Erstellung der Primer wurde das Programm DNA-Star verwendet und so eingestellt, dass die Primer eine Länge von 17-23 bp haben und einen GC-Gehalt von 40-60 % besitzen. Die T_m wurde zwischen 54°C und 56°C gewählt. Das Amplikon wurde auf eine Länge zwischen 80 und 300 bp festgelegt und durch eine BLAST Suche dessen Einmaligkeit bestätigt. Primer wurden über Metabion als HPLC gereinigter 100 µM Ansatz bezogen.

Standardherstellung

Die Produktion der Standard cDNA erfordert ein weiteres Primerpaar, welches etwa 1 kb der zu untersuchenden Gensequenz und die 80 bis 300 bp lange Zielsequenz einschließt. Zur Herstellung von Standard cDNA wurde ein 350-550 bp langes Fragment des gewählten Gens mittels dreier 25 µl PCR Reaktionen mit 30-35 Zyklen amplifiziert. Als Template diente cDNA. Die Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und die DNA mit dem innuPREP Gel Extraktions Kit von Analytik Jena reisoliert. Die PCR Fragmente wurden photometrisch quantifiziert und auf ihre Güte untersucht (Bonasera, Alberti und Sacchetti, 2007). Die Menge an PCR Produkt wurde nochmals in einer Gelelektrophorese in einem 1.5 % Agarosegel mittels Massenstandard überprüft. Die molekulare Masse (g/mol) des PCR Produkts (M_{PCR}) wurde mit dem Web basierenden Programm OligoAnalyzer bestimmt (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>). Die molekulare Masse von 10^9 Molekülen des Produkts (M_{10^9}) wurde durch Division der molekulare Masse des PCR Produkts durch die Avogadrozahl N_A ($6,023 \times 10^{23}$) und anschließender Multiplikation mit 10^{18} kalkuliert.

$$M_{10^9} = ((M_{\text{PCR}} / N_A) \times 10^{18})$$

Um die Konzentration von 10^9 Molekülen pro $10 \mu\text{l}$ in der Standardlösung einstellen zu können, wurde das kalkulierte Gewicht durch die anfänglich ermittelte Konzentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$) an PCR Produkt geteilt und mit dem finalen Volumen der Standardlösung multipliziert. Dann wurde die Lösung zum finalen Volumen aufgefüllt. Ein Stock mit 10^9 Molekülen per $10 \mu\text{l}$ des Produkts wurde angelegt und Verdünnungen von 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Molekülen pro $10 \mu\text{l}$ wurden erstellt. $30 \mu\text{l}$ jeder Verdünnungsstufe wurden in PCR Reaktionsgefäße aliquotiert, eingefroren und bei Bedarf zur qPCR verwendet.

Ermittlung der optimalen Primerkonzentration

Mit einer Primermatrix wurden die optimalen Primerkonzentrationen für jedes Paar ermittelt. Dazu wurden qPCR Reaktionen mit Primerkonzentrationen von 50 bis 300 nM durchgeführt und die Konzentration mit der höchsten Effizienz ausgewählt. Die Primer die in dieser Arbeit für die qPCR Analyse erstellt wurden (5'PR1, 3'PR1 5'PDF1.2, 5'PDF1.2) zeigen eine optimale Effizienz wenn sie als $15 \mu\text{M}$ Lösung zur qPCR verwendet werden. SYBR green wird zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration und zur qPCR Messung als 1:400 verdünnte Lösung eingesetzt.

Primermatrixansatz:

10 μl 2x Takara Premix

0,1 μl SYBR green

1 μl standard $10^4/10 \mu\text{l}$

11,1 μl Gesamtvolumen

RNA Isolation und cDNA Synthese

100 mg Pflanzenmaterial wurde direkt nach der Ernte in flüssigem N_2 tiefgefroren und gemörsert. Mit dem Spectrum Total RNA Kit von Sigma-Alrich wurde nach Herstellerangaben die totale RNA extrahiert und DNA Kontaminationen durch einen DNA Verdau entfernt. Die RNA Konzentration und Güte wurde photometrisch bestimmt und dann $1 \mu\text{g}$ der RNA zur cDNA Synthese eingesetzt. Die fertige cDNA ($20 \mu\text{l}$) wurde anschließend 1:10 verdünnt.

Material und Methoden

qPCR Messung

Vor Gebrauch wurde die cDNA erneut 1:10 verdünnt und aliquotiert. Zur Messung wurde 10,2 µl Mastermix mit 9,8 µl cDNA oder Standard cDNA mittels einer Multikanalpipette in einer 96 Well Platte gemischt und diese mit ICycleriQ™ Optical Tape versiegelt. Jede Probe wurde als technisches Duplikat pipettiert. Die qPCR Messung erfolgte in einem Bio-Rad MyIQ Cycler.

Mastermix für qPCR:

10 µl 2x Takara Premix

0,2 µl Primer 5` (Konzentration abhängig von zuvor ermitteltem Optimum)

0,2 µl Primer 3` (Konzentration abhängig von zuvor ermitteltem Optimum)

0,1 µl SYBR green

10,5 µl Gesamtvolumen

Tabelle 2: Thermoprofil für Standard qPCR

erste Denaturierung	95 °C	3 min	} x1
Denaturierung	95 °C	10 s	
Annealing	58 °C	18 s	} x40
Elongation	72 °C	18 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Schmelzkurvenanalyse	60 °C - 95 °C	8 min 20 s	} x1
Abkühlphase	12 °C	∞	

Datenaufbereitung

Mit dem Biorad IQ5 Programm wurden die Messwerte, sogenannte Ct (threshold cycle) Werte, der technischen Duplikate jeder Probe und jedes Standards auf Gleichförmigkeit überprüft und im Falle von Abweichungen > 1 Ct aus der Berechnung der Expressionswerte entfernt. Anschließend wurde die vom Cyclor errechnete Effizienz der qPCR überprüft und sichergestellt, dass eine Effizienz zwischen 85% und 110% erreicht wurde. Eine geringere Effizienz deutet auf PCR inhibierende Substanzen hin und macht eine Wiederholung der kompletten Messung notwendig. Um die Spezifität der PCR zu überprüfen wurde die Schmelzkurve des Experiments dann auf Zusatzamplifikate hin untersucht, da diese die Quantifizierung verfälschen können. Dann wurden die absoluten Expressionswerte (SQ mean) und zugehörige Probenamen in Microsoft Excel exportiert. Von diesen Werten wurden sowohl die Expressionsdaten (SQ mean) der Wasserkontrolle subtrahiert, als auch die der genomischen DNA.

Dann wurde der Normalisierungsfaktor bestimmt. Dazu wurde der absolute Expressionswert der Kontrollprobe, meist WT Wurzel +Fe, durch den absoluten Expressionswert der Kontrollgene jeder Probe geteilt. Als Kontrollgene wurden dazu *EFc* und *UBP6 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE6)* verwendet. Dieser Normalisierungsfaktor wurde dann mit den Expressionswerten aller Proben bei jedem gemessenen Gen multipliziert. Expressionsmittelwerte und die Standardabweichung wurden schließlich aus den biologischen Replikaten errechnet und in einem Balkendiagramm dargestellt.

5.2.2.2 Expressionsanalyse mittels Mikroarray

RNA Extraktion und Chip Hybridisierung

In dieser Arbeit wurde der one-color Agilent Genexpressionschip V4 (4x44K) für *Arabidopsis thaliana* verwendet, der 26283 Gene enthält. Die totale RNA Extraktion wurde nach Protokoll mit einem RNeasy Plant Mini Prep Kit von Quiagen aus ganzen 6d alten Keimlingen durchgeführt. Die RNA wurde entsprechend dem Protokoll einem DNase I Verdau unterzogen und wenigstens 1µg total RNA pro Probe wurden anschließend zur ATLAS Biolabs GmbH (Friedrichstraße 147, 10117 Berlin) überstellt. Dort wurde die Biotin markierte cRNA erstellt, die Chip Hybridisierung durchgeführt und die Chip Daten ausgelesen.

Datenanalyse

Nach Anleitung des Chip Herstellers wurden die Expressionswerte mit dem 75%-Wert normalisiert, indem alle Werte für detektierte Signale (gProcessedSignal) durch ihre entsprechenden 75% Werte (gPercentileIntensityProcessedSignal) geteilt wurden (http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90041_One-Color_Tecan.pdf). Dann wurden diese Rohdaten mit der online Software NIA Array Analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/index.html>) erneut normalisiert und auf differentiell regulierte Gene im Vergleich zum WT untersucht, wobei ein fold-change Wert von 2,0 festgelegt wurde. Der Normalisierung mit NIA Array liegt eine nicht parametrische Analyse zugrunde, die verschiedenste Quantile der Genexpressionswahrscheinlichkeitsverteilung gleichsetzt. Dazu werden die Daten zuerst log-transformiert, dann werden pro Spalte 15 Quantile berechnet, die die Ratio 1/30, 3/30...29/30 besitzen. Danach werden 15 Zielquantile als Durchschnitt aller Spalten kalkuliert. Darauf erfolgt eine Transformation der Daten mit einer stückweisen linearen Funktion, die die aktuellen Quantile in jeder Spalte in Zielquantile konvertiert. Alle Daten über der höchsten Quantile werden basierend auf der linearen Funktion zwischen den beiden höchsten Quantilen transformiert. Schließlich werden alle Daten mit der Exponentialfunktion wieder zurücktransformiert. Die statistische Analyse der NIA Plattform basiert auf der ANalysis Of VAriance (ANOVA). Die statistische Signifikanz wurde nach der False Discovery Methode (FDR) ermittelt. Die normalisierten Rohdaten sind unter <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/> mit dem User Login: „**Gast**“ und dem Password: „**Arabidopsis**“ verfügbar. Der dort abgelegte Datensatz trägt den Namen „FelixMaurerRohdaten3xbHLH“. Zur Analyse wurden folgende Einstellungen verwendet: error model “max (average, actual)”, proportion of highest variance values to be removed before variance averaging “0.01”, degrees of freedom for the Bayesian error model “10”, Benjamini and Hochberg False discovery rate (FDR) threshold “0.05”, zero mutations.

5.2.3 DNA Analysen

5.2.3.1 Genotypisierungs PCR

Zur Genotypisierung von bHLH Einzel- und Mehrfachmutanten wurden die unter 5.1.4.1 aufgeführten Primer verwendet. Die Amplifikation des WT Allels wurde mit dem RP und LP Primer des zu untersuchenden Gens durchgeführt, die T-DNA Insertion wurde mit dem Salk LBb1 Primer in Verbindung mit dem RP Primer des zu untersuchenden Gens amplifiziert (Tabelle 3). Der Mastermix wurde in PCR-Gefäßen vorgelegt und pro Reaktion wurde 0,5 µl der zu untersuchenden DNA zugegeben. Das Thermoprofil der Genotypisierungs PCR ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Primerkombinationen und PCR-Produktgrößen zur Genotypisierungs PCR

Produktname	Primer 5'	Primer 3'	Produktgröße
BHLH38 WT	BHLH38 LP	BHLH38 RP	1025 bp
BHLH38 TDNA	Salk LBb1	BHLH38 RP	736 bp
BHLH39 WT	BHLH39 LP	BHLH39 RP	1021 bp
BHLH39 TDNA	Salk LBb1	BHLH39 RP	711 bp
BHLH100 WT	BHLH100 LP	BHLH100 RP	1025 bp
BHLH100 TDNA	Salk LBb1	BHLH100 RP	693 bp
BHLH101 WT	BHLH101 LP	BHLH101 RP	1023 bp
BHLH101 TDNA	Salk LBb1	BHLH101 RP	654 bp

Mastermix für Genotypisierungs PCR:

6,25 µl JumpStartREDTaq Ready Mix

0,5 µl Primer 5'

0,5 µl Primer 3'

4,25 µl H₂O

11,5 µl Gesamtvolumen + 0,5 µl DNA jeweils

Tabelle 4: Thermoprofil für Genotypisierungs PCR

erste Denaturierung	94°C	3 min	} X 1
Denaturierung	94°C	20 s	
Annealing	64°C -1°C pro Zyklus	20 s	} X 8
Elongation	72°C	1 min	
Denaturierung	94°C	20 s	
Annealing	57°C	20 s	} X 30
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	
Abkühlphase	12 °C	∞	} X 1

5.2.4 Proteinanalysen

5.2.4.1 Western Blot

Wurzel und Blätter wurden zur Proteinextraktion getrennt geerntet gewogen und gemörsert. Abhängig von der Menge des Pflanzenmaterials wurde 2x Laemmli Puffer zur Extraktion zugegeben. Die Extraktion erfolgte unter 10000 x g für 5 Minuten bei 4°C. Gleiche Mengen des Proteinextraktüberstands wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 12% SDS-Polyacrylamidgelen. Dann wurden die Proben unter elektrischer Spannung auf eine Nitrozellulosemembran (Schleier & Schuell) geblottet, Ponceau S gefärbt und zur Ladungskontrolle fotografiert.

Die Membran wurde mittels SNAP ID System (Merck-Millipore) mit dem primären hoch affinen monoklonalen Ratten Anti-HA Antikörper (1:1000) und dem sekundären

Material und Methoden

Anti-Ratte IgG meerrettichperoxidasegekoppelten Antikörper (1:10000) nach Herstellerangaben inkubiert und anschließend gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit ECL Chemiluminiszenzreagenzien (GE Health Care) durch Inkubation mit einem Film nach Herstellerangaben in der Dunkelkammer. Anschließend wurde der Film entwickelt.

5.2.4.2 Reduktaseassay

Um die räumliche Lokalisierung und Stärke der Eisenreduktaseaktivität mittels Agarfärbung zu untersuchen, wurden Pflanzen für 6d auf 1xHoaglandagar mit 0/50 μM FeNaEDTA angezogen und dann auf 0,7% Agarplatten mit 0,5 mM FeNaEDTA, 0,5 mM CaSO_4 und 0,25 mM Ferrozin überführt. Das von Ferrozin komplexierte Fe(II) zeigt aufgrund seiner Violettfärbung die Wurzelregionen mit Eisenreduktaseaktivität an. Die Pflanzen wurden für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert und das Ergebnis fotografisch festgehalten (Schmidt et al., 2000).

5.2.5 Pharmakologische und hormonelle Analysen

Cycloheximid

Um die Proteintranslation zu unterbinden wurden Pflanzen für 6d auf Hoaglandagarplatten angezogen und dann in flüssiges Hoaglandagarmedium mit 50 μM Cycloheximid (Sigma Aldrich) (50 mM Stock gelöst in DMSO) überführt und für 1h inkubiert. Die ganzen Keimlinge wurden entweder direkt geerntet oder die Wurzeln wurden gewaschen und die Keimlinge für 3h auf frische Hoaglandagarplatten überführt und dann geerntet.

Ibuprofen

10 μM Ibuprofen (10 mM Stock in 70% Ethanol) wurden in angezeigten Versuchen dem Hoaglandmedium zugesetzt und die Pflanzen entsprechend der Angaben des jeweiligen Experiments darauf kultiviert.

Jasmonat, Methyljasmonat

100 μM Jasmonat (100 mM Stock in 70% Ethanol) oder 100 μM Methyljasmonat (100 mM Stock in 70% Ethanol) wurden in angezeigten Versuchen dem Hoaglandmedium

zugesetzt und die Pflanzen entsprechend der Angaben des jeweiligen Experiments darauf kultiviert.

Salizylat

100 μM Salizylat (Stock 200 mM in 70% Ethanol) wurde in angezeigten Versuchen dem Hoaglandmedium zugesetzt. Zu behandelnde Pflanzen wurden für 6h auf dem salizylathaltigen Medium kultiviert.

ACC

10 μM 1-Aminocyclopropan-1-Karbonsäure (Sigma-Aldrich) wurde zur Behandlung dem Hoaglandagarmedium zugesetzt und die zu behandelnden Pflanzen wurden auf diesem Medium ausgekeimt und für 6d kultiviert.

AVG

10 μM Aminoethoxyvinylglycin (Sigma-Aldrich) wurde zur Behandlung dem Hoaglandagarmedium zugesetzt und die zu behandelnden Pflanzen wurden auf diesem Medium ausgekeimt und für 6d kultiviert.

5.2.6 Methoden der analytischen Chemie

5.2.6.1 Metallmessung

Die oberirdischen Pflanzenteile wurden geerntet, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend 1 Tag bei 120°C inkubiert. Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde dann in einem Achatmörser zu feinem Puder zermahlen. Die Metallgehalte des zerkleinerten Pflanzenmaterials wurden schließlich per Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy (GF-AAS) im Leibniz Institut für Neue Materialien (INM, Saarbrücken) bestimmt.

5.2.7 Molekularbiologische Techniken

Standardmethoden der Molekularbiologie wie Agarosegelelektrophorese, Plasmidpräparation aus *E.coli* und DNA Präparation aus Pflanzengewebe wurden entsprechend dem allgemein anerkannten Nachschlagewerk Molecular Cloning: A

Laboratory Manual (Sambrook, Fritsch und Maniatis, 2nd edition, 1989) durchgeführt oder wenn ein Kit verwendet wurde folgte das Protokoll den vom Hersteller mitgelieferten Angaben.

5.2.7.1 Gatewayklonierung

Zur Herstellung des *BHLH38* miRNA exprimierenden Vektors pMDC32 (siehe auch 5.2.7.2) und des pALLIGATOR2-*BHLH39* wurde das Gatewayklonierungssystem nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen) verwendet (Karimi, Depicker und Hilson, 2007). Dazu wurden die Konstrukte (*BHLH38*-miRNA; *BHLH39*) per PCR mit Gatewayrekombinationsstellen versehen und jeweils in einer BP Reaktion in den Vektor pDONR207 ligiert. Anschließend wurde jedes der beiden Konstrukte (*BHLH38*-miRNA; *BHLH39*) vom pDONR207 Vektor mittels LR Reaktion in den jeweiligen Zielvektor (pMDC32; pALLIGATOR2) übertragen.

5.2.7.2 Klonierungsstrategie zur Erstellung eines *BHLH38* miRNA exprimierenden Vektors

Das Protokoll wurde von Rebecca Schwab (MPI für Entwicklungsbiologie, Tuebingen) adaptiert.

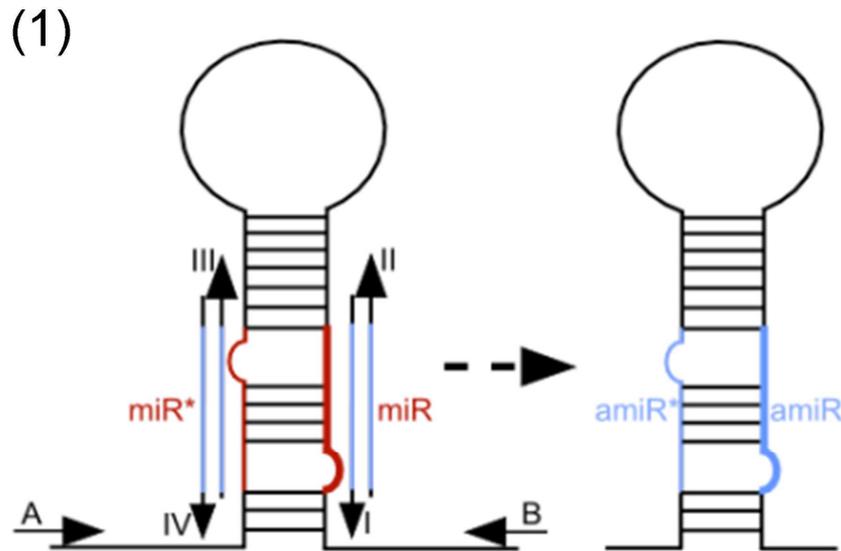
MiRNAs führen in Pflanzen zur Spaltung ihrer Ziel mRNA gegenüber Position 10 und 11 der miRNA und damit zu ihrem Abbau (Llave et al., 2002). Mit der Modifikation von Arabidopsis miRNA Vorläufern kann ein solcher Abbau auf einzelne Gene gerichtet werden um ihre Expression zu verhindern (Schwab et al., 2006). Das Internet basierende Programm WMD microRNA Designer (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdwmd>) vereinfacht die Auswahl einer effizienten miRNA für jedes beliebige Zielgen (Schwab et al., 2006). Im Folgenden wird erläutert wie der WMD Designer dazu verwendet wurde eine *BHLH38* miRNA zu erstellen und in *Arabidopsis thaliana* zur Expression zu bringen.

Mithilfe des Programms WMD microRNA Designer wurde auf Grundlage der TAIR *BHLH38* cDNA (912 bp) eine 21 bp lange miRNA Sequenz anhand ihrer Hybridisierungsenergie und Lokalisierung in der Ziel mRNA, sowie Mismatchpositionen ausgewählt. Die zu erstellende miRNA (5'-TAGTTAAACGAGTTTTCGCAT-3') ist komplementär zur *BHLH38* cDNA in der Nähe des Stop Codons am 3' Ende des Gens (797bp - 817bp), wobei sie eine

Material und Methoden

Mispaarung an Position 18 trägt (rot markiert), da das die Wahrscheinlichkeit mindert, dass die miRNA als Primer für RNA abhängige RNA Polymerasen dient und zu sekundär RNAi Effekten führt (Schwab et al., 2006).

Zur PCR Amplifikation dieser miRNA wurden 2 Oligonukleotidsequenzen (I und II) mittels WMD microRNA Designer generiert und zwei weitere Oligonukleotidsequenzen dienten dazu in der späteren RNA Sequenz einen zu dieser miRNA komplementären Abschnitt (miRNA*) zu schaffen, der die Rückfaltung der RNA ermöglicht (III und IV, siehe auch 5.1.4.3). Diese 4 Oligonukleotide wurden in überlappenden PCR Reaktionen (a bis d) dazu verwendet die artifizielle miRNA und deren reverskomplementäre miRNA* durch gerichtete PCR Mutagenese aus der artifiziellen microRNA miR319a zu amplifizieren (Abb. 4 Teilbild 1). Als Template dient der Vektor pRS300, der die microRNA miR319a enthält. Die Amplifikation folgte den in Abb. 4 Teilbild 2 aufgeführten PCR Reaktionen (Schwab et al., 2006). Den Oligonukleotiden A und B waren zusätzlich Gatewayrekombinationsenden angefügt worden, um die fertige *BHLH38* miRNA nach erfolgreicher PCR Reaktion (d) per BP-Reaktion in den gatewayfähigen Vektor pDONR207 zu ligieren. Abschließend wurde der pDONR207 Vektor (http://www.lablife.org/p?a=vdb_view&id=g2.d7DVqHv0lrxioVcDoYgxK0fpBIk-) in einer LR-Reaktion mit dem binären Zielvektor pMDC32 (<http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/pMDC32.pdf>) zur Reaktion gebracht und dieser mittels *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV2260 (enthält Plasmid pGV2260) in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Ecotyp Col-0) mit dem Mutantenhintergrund *3xbhlh* transformiert. Die Pflanzentransformation erfolgte nach der Methode von Clough und Bent, 1998. Die transgenen Samen wurden anschließend auf ½ MS (Murashige und Skoog) Agarplatten mit 1% Saccharose und 15 µg/ml Hygromycin selektiert und bis zur Homozygotie weitervermehrt.



(2)

PCR Reaktion	5'-Primer	3'-Primer	Template
(a)	A	IV	pRS300
(b)	III	II	pRS300
(c)	I	B	pRS300
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

Abb. 4: Amplifikation einer miRNA mittels gerichteter Mutagenese

(1) In überlappenden PCR Reaktionen (a)-(d) wurde mit den Oligonukleotidprimern I-IV die native miRNA und deren komplementäre miRNA* durch artifizielle *BHLH38* spezifische Sequenzen ersetzt. Die Primer A und B basieren auf der pRS300 Plasmidsequenz, welches die native miRNA enthält und tragen gleichzeitig die Gatewayrekombinationssequenzen. (2) Ein vollständiger miRNA Vorläufer wurde durch Kombination der PCR Produkte aus (a), (b) und (c) in einer PCR Reaktion mit den Primern A und B erhalten. Teilweise übernommen von Schwab et al., 2006.

6. Ergebnisse

6.1 Verifizierung und Charakterisierung der *3xbhlh* Mutante zur Untersuchung der Genfunktionen in *Arabidopsis thaliana*

6.1.1 Kreuzung von bHLH Einfachmutanten zur Erhaltung einer homozygoten *3xbhlh* Mutante

Um die Funktionen von *BHLH38*, *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* zu untersuchen wurde aufgrund ihrer vermuteten Redundanz die Kreuzung einer T-DNA Dreifachmutante mit *BHLH38* als letztem aktivem Gen der Untergruppe angestrebt. Dazu wurden im Vorfeld mögliche Dreifachmutanten durch Kreuzen von homozygoten *bHLH039-1*, *bHLH100-1* und *bHLH101-1* T-DNA Einzelmutanten erzeugt und folgende putative Mehrfachmutantenlinien erhalten: P248-17, P248-5, P245-1, P246-1, P245-5, P246-3 und P246-4 (Prof. Dr. Petra Bauer, nicht veröffentlicht). Um eine *BHLH39/100/101* Dreifachmutante zu finden, wurden die zuvor gekreuzte putativen Mehrfachmutantenlinien per PCR auf das Vorkommen der T-DNA Insertion bzw. des WT Allels der Gene *BHLH38*, *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* hin untersucht. Ziel der Genotypisierung war es Dreifachmutanten zu finden die für *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* homozygot die T-DNA Insertion tragen und kein funktionelles WT Allel mehr besitzen. Die putativen Mehrfachmutanten waren durch Kreuzung homozygoter *BHLH100/101* Doppelmutanten mit homozygoten *bhlh39* Mutanten erzeugt worden und diese Kreuzung wurde durch Selbstung in die F2 vermehrt. Daher war für jedes der drei ausgeschalteten bHLH Gene im Genotyp eine Merkmalsverteilung von 1:2:1 zu erwarten, was einem Viertel homozygoter Pflanzen entspricht, wenn nur ein einzelnes Gen betrachtet wird. Das Zusammentreffen von drei homozygoten Merkmalen dagegen in einer Pflanze war theoretisch nur in jeder 64sten Pflanze gegeben. Um eine *BHLH39/100/101* Dreifachmutante zu finden wurden daher 75 Pflanzen der putativen Mehrfachmutanten in der F2 Generation angezogen. Unter insgesamt 600 PCR Reaktionen zur Genotypisierung (siehe Tabelle 3) der Einzelpflanzen wurde schließlich genau eine homozygote *BHLH39/100/101* KO Mutante identifiziert und *3xbhlh* (FM35 aka P248-5) benannt. Die Gelelektrophorese der PCR zur Verifikation der Mutante zeigt

Ergebnisse

jeweils eine Bande für die T-DNA spezifischen Primerpaare für *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* in den erwarteten Produktgrößen von 711 bp, 693 bp und 654 bp und keine Banden für die WT Allele der drei Gene (Abb. 5). Dadurch wird das Ausschalten der bHLH Gene durch T-DNA Insertion auf DNA Ebene bestätigt. Die Banden in der Positivkontrolle für die WT Allele stimmen mit den erwarteten Produktgrößen von 1021 bp, 1025 bp und 1023 bp überein und zeigen damit die korrekte Amplifikation der WT Allele in dieser PCR (siehe auch Tabelle 3). Die Positivkontrolle für die T-DNA zeigt das gleiche Bandenmuster wie die untersuchte Linie FM35 und bestätigt damit die korrekte Amplifikation der T-DNA Insertion in dieser PCR

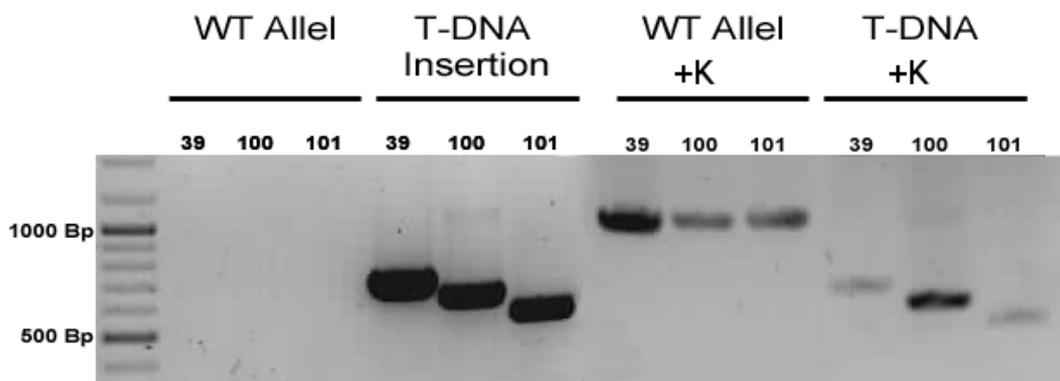


Abb. 5: Verifikation der Homozygotie für die T-DNA Insertionen *bHLH039-1*, *bHLH100-1* und *bHLH101-1* in der Linie FM35 (*3xbhlh*)

Die Pflanzen wurden für 3 Wochen auf Hoaglandagarmedium mit 50 μ M FeNa-EDTA angezogen, dann jeweils ein Blatt geerntet, die DNA isoliert und anschließend zur PCR verwendet. Zur Amplifikation des WT Allels wurden jeweils genspezifische 5' und 3' Primer eingesetzt, zur Amplifikation der T-DNA Insertion wurde der LBb1 als 5'Primer und der genspezifische als 3'Primer verwendet. Als WT +K wurde Col-0 DNA eingesetzt, als T-DNA +K wurde DNA der homozygoten Einzelmutanten *bHLH039-1*, *bHLH100-1* und *bHLH101-1* verwendet.

6.1.2 Untersuchung phänotypischer Merkmale in Abhängigkeit der Eisenversorgung

Nach der Genotypisierung wurde die Mutante zur Samenproduktion vermehrt und anschließend unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen um mögliche Phänotypen zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass die *3xbhlh* Mutante unter +Fe Bedingungen keinen Phänotyp zeigt. Beim Auskeimen direkt auf Eisenmangelbedingungen allerdings zeigt sich nach 5 bis 10 Tagen eine schwere Chlorose, bei der die jüngeren Rosettenblätter hellgrün bis gelblich gefärbt sind und die stärker betroffenen älteren Blätter gelblich bis fast weiß gefärbt sind (Abb. 6 A). Um die Chlorosestärke in Mutante und WT vergleichen zu können erfolgte eine Bonitierung der Blattchlorose auf einer Skala von 1 bis 5, wobei 1 dem Dunkelgrün einer gesunden Pflanze entspricht und 5 einer so starken Chlorose, dass die Blätter nur noch Gelb- und Weißtöne zeigen (Abb. 6 B). Die Untersuchung zeigt, dass nach 10 Tagen WT und Mutante bei +Fe mit Werten unter 1,5 keine Chlorose zeigen und dass beide Genotypen im Vergleich zu +Fe Bedingungen eine signifikante Chlorose beim Auskeimen auf –Fe Medium entwickeln. Vergleicht man WT und Mutante bei –Fe zeigt sich eine signifikant stärkere Chlorose in der *3xbhlh* Mutante. Da der Phänotyp der *3xbhlh* Mutante nur nach langanhaltendem Eisenmangel sichtbar wird, wäre es möglich, dass zwar nicht Eisenaufnahme oder Transport in der Mutante gestört sind, aber bei längerem Eisenmangel Stressreaktionen ausgelöst werden, die in dieser Mutante durch das Fehlen der bHLH Transkriptionsfaktoren zu einer phänotypischen Veränderung führen. Um die Mutante näher zu charakterisieren wurden daher im nächsten Schritt Expressionsanalysen durchgeführt.

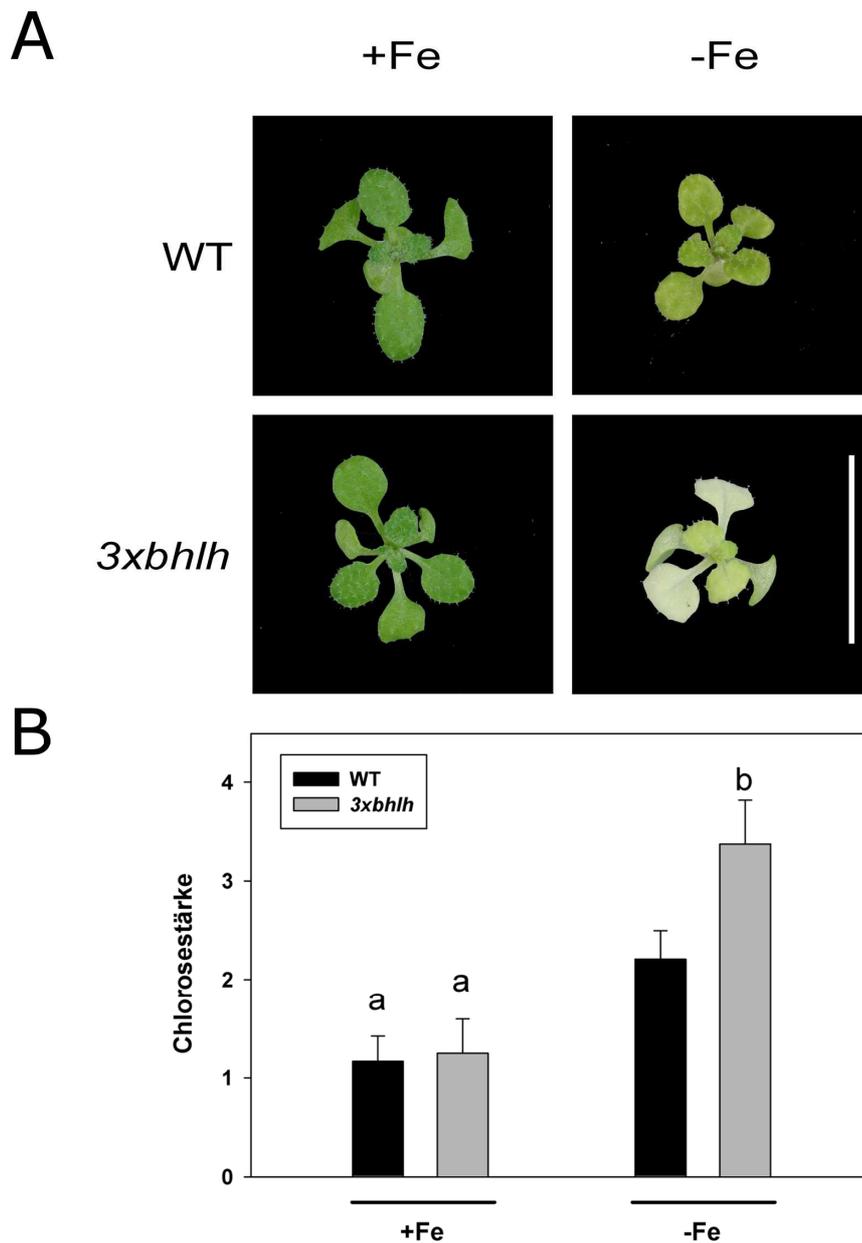


Abb. 6: Phänotyp und Bonitierung der auf Hoaglandagarmedium gewachsenen *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum WT

3xbhlh und WT Pflanzen wurden bei Langtagbedingungen für 10 Tage auf +Fe (50 μ M FeNa-EDTA) und -Fe (0 μ M FeNa-EDTA) kultiviert (A). Der Größenmaßstab entspricht 5mm. Anschließend erfolgte eine Bonitierung der Blattchlorose der WT und *3xbhlh* Pflanzen auf einer Skala von 1 bis 5 (B). Dabei entspricht 1 dem Dunkelgrün einer gesunden Pflanze, 2 repräsentiert grün mit leichten Gelbanteilen, 3 steht für eine gelbgrüne Farbe einer sichtbaren Chlorose, 4 entspricht einer durchgehenden Gelbfärbung mit leichten Grünanteilen und 5 einer so starken Chlorose, dass die Blätter nur noch Gelb- und Weißtöne zeigen. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=12. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb eines Genotyps sind mit einem "a" gekennzeichnet, statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT und *3xbhlh* bei gleicher Eisenversorgung sind mit einem "b" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

Ergebnisse

Dazu wurde zuerst überprüft ob die *3xbhlh* Mutante auch tatsächlich keine Transkripte der ausgeschalteten Gene mehr produzieren kann und wie das verbliebene *BHLH38* im Mutantenhintergrund bei +Fe bzw. -Fe reagiert. Es wurde eine Expressionsanalyse mit 14 Tage alten *3xbhlh* Mutanten und WT Pflanzen, die für 3 weitere Tage bei -Fe oder +Fe angezogen worden waren, durchgeführt. Die Expression von *BHLH38*, *39*, *100* und *101* wurde in Wurzeln (Abb. 7 A) und Blättern (Abb. 7 B) mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) untersucht. Die Analyse zeigt, dass bei +Fe sowohl in Wurzeln (A) als auch in Blättern (B) in WT und *3xbhlh* Mutante kaum Expression der Gene zu messen ist, außer für *BHLH38* dass in Wurzeln der Mutante signifikant stärker exprimiert ist als im WT. Bei -Fe werden die Transkriptionsfaktoren im WT wie erwartet in beiden Geweben induziert, dabei ist in beiden Fällen in der *3xbhlh* Mutante nahezu keine Expression für *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* zu messen und bestätigt damit die Ausschaltung der Gene auf Transkriptebene. Die Induktion von *BHLH38* als Antwort auf den Eisenmangel findet auch in der Mutante in beiden Geweben statt, ist allerdings signifikant stärker als im WT. Möglicherweise wird *BHLH38* in der Mutante bei -Fe stärker induziert, um die vermutlich teilweise redundanten Funktionen der fehlenden bHLH Transkriptionsfaktoren zu übernehmen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse klar, dass in der Mutante *BHLH39*, *BHLH100* und *BHLH101* ausgeschaltet sind und im Folgenden sollen weitere Studien klären, ob die Genexpression von Eisenhomöostasegenen in der Mutante verändert ist.

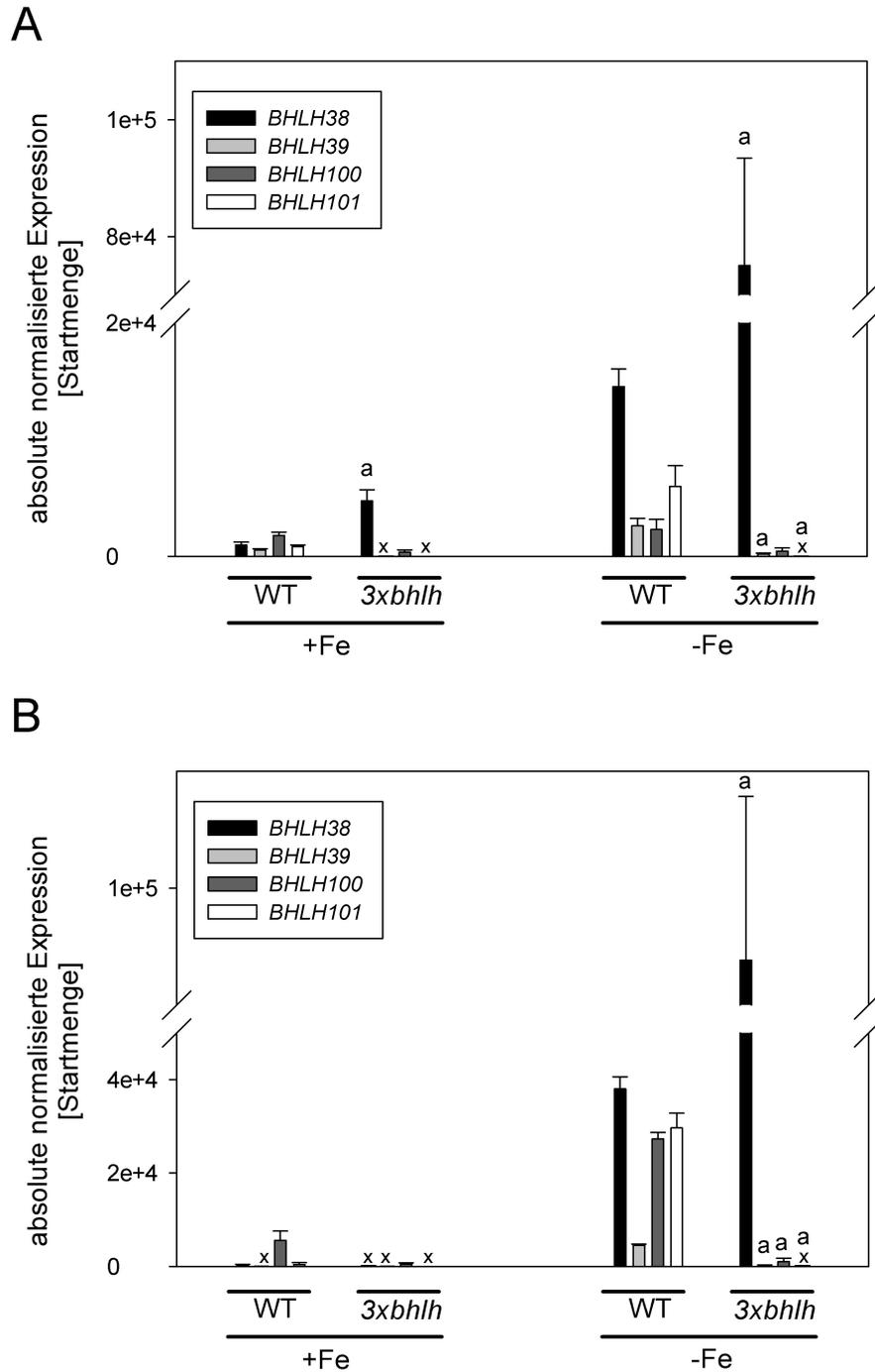


Abb. 7: Expressionsanalyse der dreifach T-DNA Insertionslinie *bHLH039-1*, *bHLH100-1* und *bHLH101-1* 14 Tage alte *3xbhlh* Mutanten und WT Pflanzen wurden für 3 Tage bei Eisenmangelbedingungen (0 μM FeNa-EDTA) und ausreichender Eisenversorgung (50 μM FeNa-EDTA) angezogen. Die Expression von *BHLH38*, *39*, *100* und *101* wurde in Wurzeln (A) und Blättern (B) mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=4. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem "a" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben), dazu wurden jeweils Werte der Mutante mit Werten des WT derselben Bedingung verglichen.

6.1.3 Genexpressionsstudien der Eisenmangelmarkergene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* in Wurzeln und *FRO3*, *YSL1* und *FER1* in Blättern der *3xbhlh* Mutante

Mittels qRT-PCR sollte überprüft werden ob die *3xbhlh* Mutante durch das Fehlen von *BHLH39/100/101* eine Beeinträchtigung der Eisenmangelantwortgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* zeigt (Abb. 8A). Die Ergebnisse können Aufschluss darüber geben, ob die fehlenden Transkriptionsfaktoren essentiell für die Eisenmangelantwort sind oder ob zumindest *bHLH38/39*, für die man annimmt, dass sie mit *FIT* im Heterokomplex *FRO2* und *IRT1* regulieren, derartig redundant sind, dass bereits die Anwesenheit von *bHLH38* ausreicht um die putativen Zielgene bei Eisenmangel zu induzieren (Yuan et al., 2008; Wang et al., 2007). Gleichzeitig wurde die Mutante auch dazu verwendet Erkenntnisse über die zusätzlichen Funktionen der *bHLH* Transkriptionsfaktoren *Ib(2)* im Blatt zu erlangen, die die induzierte Expression im WT bei $-Fe$ erklären, da dieser Themenkomplex bisher gänzlich unerforscht ist und Hinweise über die Funktion im Blatt vielleicht den Phänotyp der Mutante erklären können. Dazu wurde die Genexpression von Genen untersucht, die für die Fe^{3+} -Chelatreduktase *FRO3* der mitochondrialen Membran, den transmembranen Eisen-Nicotianamin Transporter *YSL1* und das Chloroplasten lokalisierte Eisenspeicherprotein *FER1* kodieren (Abb. 8B). Dazu wurden *3xbhlh* Mutanten und WT Pflanzen für 14 Tage bei $+Fe$ angezogen, dann für 3 Tage auf $+Fe$ bzw. $-Fe$ überführt und schließlich die Wurzeln (Abb. 8A) und Blätter (Abb. 8B) zur Expressionsanalyse verwendet. In WT Wurzeln sind *FIT*, *FRO2* und *IRT1* als Antwort auf den Eisenmangel signifikant induziert (Abb. 8A), ebenso wie in der Mutante. Die eisenmangelvermittelte Induktion dieser vier Gene ist also auch in der Mutante voll funktionsfähig und zeigt damit, dass wenigstens *BHLH38/39* wahrscheinlich redundante Funktionen besitzen. In Blättern des WT sind *YSL1* und *FER1* erwartungsgemäß bei $-Fe$ schwächer exprimiert als bei $+Fe$, während *FRO3* leicht induziert wird. In der Mutante zeigen diese Gene ähnliche Transkriptzahlen, allerdings ist *FER1* bei $+Fe$ signifikant schwächer exprimiert als im WT, was auf eine geringere Eisenmenge in den Blättern hindeuten könnte. Das heißt, möglicherweise ist zwar die Eisenaufnahme nicht betroffen, das Eisen wird aber innerhalb der Pflanze nicht wie im WT zu den Blättern transportiert. Insgesamt sind keine so extremen Abweichungen von den WT Expressionsmustern der Eisenhomöostasegene zu erkennen, die direkt auf das Fehlen von *BHLH39/100/101* zurückzuführen sind. Die Eisenmangelantwort in Wurzeln

Ergebnisse

ist noch funktionell und auch in Blättern ist bis auf die Eisenspeicherung durch *FER1* keine gravierende Abweichung vom WT erkennbar, dasselbe gilt, wenn die Pflanzen 10 Tage unter +Fe bzw. -Fe Bedingungen angezogen wurden, so dass der Phänotyp sichtbar war (Daten nicht dargestellt). Um die durch Expressionsanalysen erhaltenen Ergebnisse über die Eisenaufnahmegene in der *3xbhlh* abzusichern, wurde zusätzlich die Eisenkonzentration und Eisenreduktion in der Mutante untersucht (Abb. 9 und Abb. 10). Geht man davon aus, dass bHLH38/39 mit *FIT* zur Induktion von *FRO2* und *IRT1* notwendig sind, werden zumindest die Funktionen bei der Eisenmangelantwort in der Mutante mutmaßlich von bHLH38 übernommen. Um weitere Aussagen über die Funktion der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren machen zu können wurde daher geplant auch *BHLH38* in der *3xbhlh* Mutante auszuschalten. Dazu wurde die Kultivierung einer vollständigen *BHLH38/39/100/101* Mutante mittels RNA Interferenz angestrebt (siehe Absatz 6.1.6). Da die *3xbhlh* Mutante allerdings einen Phänotyp besitzt der bei langanhaltendem Eisenmangel vermutlich durch Stressreaktionen hervorgerufen wird, kann die *3xbhlh* Mutante dazu verwendet werden Funktionen der bHLH Ib(2) Untergruppe in eisenmangelvermittelten Stressantworten zu untersuchen. Daher wurde die *3xbhlh* Mutante als wichtiges Werkzeug zur Erforschung der Transkriptionsfaktorgruppe vollständig charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden die gewonnen Expressionsdaten in den nächsten beiden Abschnitten mit dem Eisengehalt und der Reduktaseaktivität der Mutante verglichen. Um außerdem die mögliche Rolle der vier bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren in Stressantworten zu untersuchen, wurde aufgrund der Induzierbarkeit von *BHLH38/39* durch Salizylat die Mutante im Zusammenhang des Salizylatstressnetzwerks untersucht (siehe Abschnitt 6.1.8.).

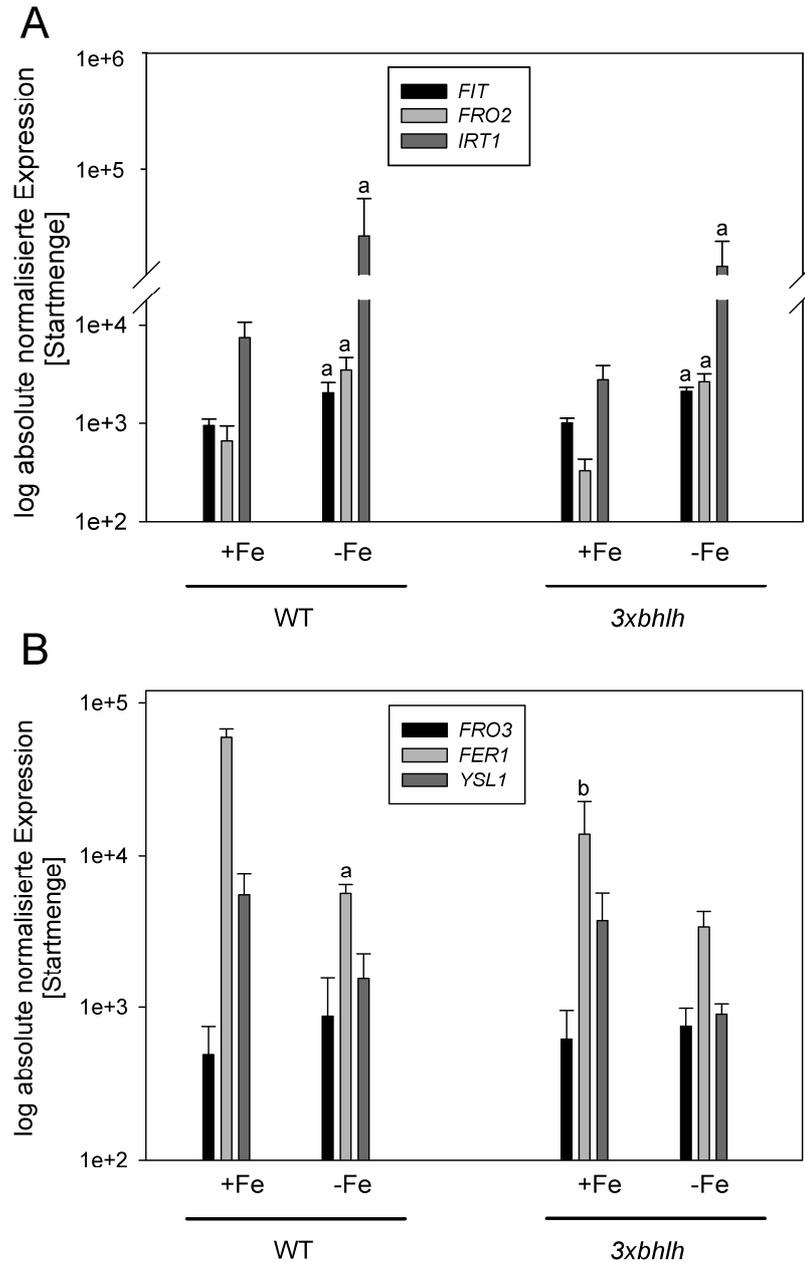


Abb. 8: Expressionsanalyse von eisenregulierten Genen in Wurzeln und Blättern der dreifach T-DNA Insertionslinie *bHLH039-1*, *bHLH100-1* und *bHLH101-1*.

14 Tage alte *3xbhlh* Mutanten und WT Pflanzen wurden für 3 Tage auf Hoaglandagarplatten bei Eisenmangelbedingungen (0 μ M FeNa-EDTA) und ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) angezogen. Die Expression von *FIT*, *FRO2*, *IRT1* in Wurzeln (A) und *FRO3*, *FER1*, *YSL1* in Blättern (B) wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=4. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen +Fe und -Fe Bedingungen eines Genotyps sind mit einem "a" gekennzeichnet, statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Mutante und dem WT bei gleicher Bedingung sind mit einem "b" markiert (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

6.1.4 Messung des Eisengehalts in der *3xbhlh* Mutante

Als Maß für die Eisenaufnahme in die Pflanze wird hier die Fe Konzentration in getrockneten Blättern untersucht. Damit soll überprüft werden ob die WT ähnliche Expression von *IRT1* in der *3xbhlh* Mutante auch zu einer wildtypischen Eisenaufnahme geführt hat. Dazu wurden WT und *3xbhlh* Pflanzen für 2 Wochen auf Hoaglandagarplatten mit ausreichender Eisenversorgung angezogen und dann für 3 Tage bei genügender Eisenversorgung oder Eisenmangel weiter kultiviert. Nach der Ernte der Blätter wurden das Pflanzenmaterial getrocknet, gemörsert und zur AAS Messung verwendet (Abb. 9). Bei +Fe und -Fe Bedingungen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante und WT, wie erwartet enthalten beide Linien bei +Fe mehr Eisen als bei -Fe (Abb. 9). Das Ergebnis bestätigt die WT ähnliche *IRT1* Expression in der *3xbhlh* Mutante (Abb. 8A) und verstärkt die Annahme, dass die Mutante wenigstens in der Eisenaufnahme, durch die redundanten Funktionen der Ib(2) bHLH Transkriptionsfaktoren, nicht beeinträchtigt ist. Um diese Annahme weiter zu überprüfen wurde auch die FRO2 Aktivität gemessen (Abb. 10).

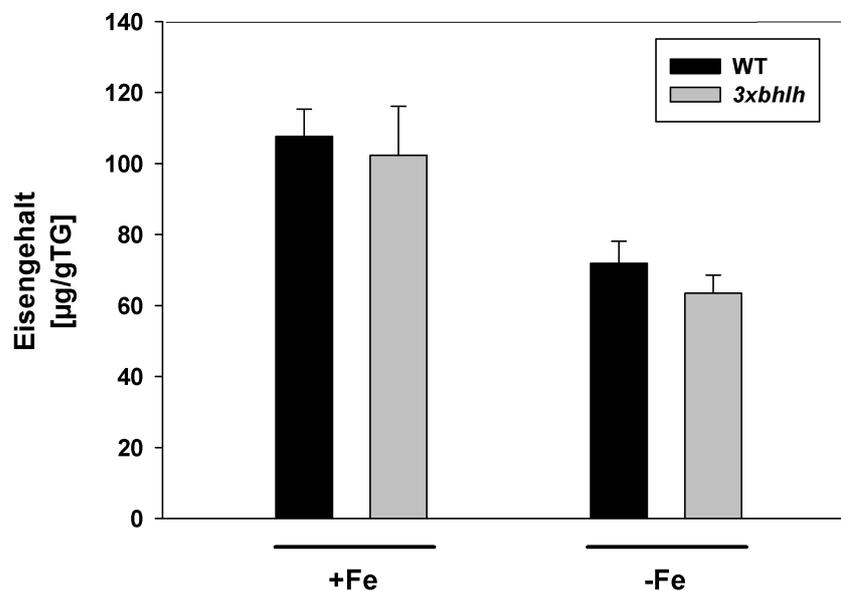


Abb. 9: Eisengehalt in Blättern von WT und *3xbhlh* Pflanzen

Die Pflanzen wurden für 2 Wochen auf Hoaglandagarplatten mit ausreichender Eisenversorgung (50µM Fe) angezogen und dann für 3 Tage bei genügender Eisenversorgung (50µM FeNa-EDTA) oder Eisenmangel (0µM FeNa-EDTA) weiter kultiviert. Nach der Ernte der Blätter wurden das Pflanzenmaterial getrocknet, gemörsert und zur ICP-AAS Messung verwendet. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=4. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

6.1.5 Test der Reduktaseaktivität in der *3xbhlh* Mutante

Um die Eisenmangelantwort in der *3xbhlh* vollständig zu charakterisieren wurde auch die Eisenreduktaseaktivität untersucht. Dazu wurden WT und *3xbhlh* Pflanzen für 2 Wochen auf Hoaglandagarplatten mit ausreichender Eisenversorgung angezogen und dann für 3 Tage bei genügender Eisenversorgung oder Eisenmangel weiter kultiviert und anschließend die Eisen(III)chelate-Reduktaseaktivität photometrisch bestimmt (Abb. 10). In beiden Pflanzenlinien ist die Reduktaseaktivität bei $-Fe$ im Vergleich zu $+Fe$ induziert. Dabei ist im WT unter beiden Bedingungen die Reduktaseaktivität stärker als in der Mutante, allerdings sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse bestätigen die Genexpressionsdaten für *FRO2* (Abb. 8A). Fasst man die Erkenntnisse aus der Genexpression von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* sowie die Metallmessung und den Reduktaseassay zusammen, kann sehr wahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass die Eisenaufnahme der Mutante nicht gravierend beeinträchtigt ist. Der Phänotyp ist daher eher durch das Fehlen der bHLH Transkriptionsfaktoren in Stressreaktionen als Antwort auf Eisenmangel zu erklären. Daher ist zumindest zur Untersuchung der Rolle der bHLH Ib(2) Gruppe in der Eisenaufnahme eine vollständige KO Mutante notwendig (siehe 6.1.6).

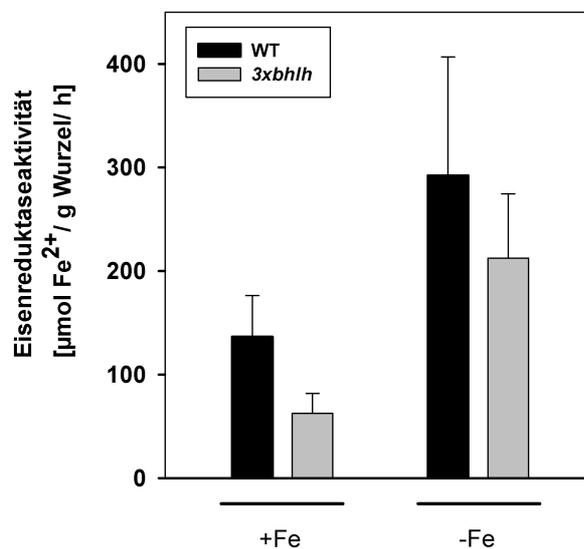


Abb. 10: Eisen(III)chelate-Reduktaseaktivitätstest mit WT und *3xbhlh* Wurzeln

Die Pflanzen wurden für 2 Wochen auf Hoaglandagarplatten mit ausreichender Eisenversorgung ($50\mu\text{M Fe}$) angezogen und dann für 3 Tage bei genügender Eisenversorgung ($50\mu\text{M FeNa-EDTA}$) oder Eisenmangel ($0\mu\text{M FeNa-EDTA}$) weiter kultiviert und anschließend die Eisen(III)chelate-Reduktaseaktivität photometrisch bestimmt. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, $n=5$. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

6.1.6 Kultivierung einer *4xbhlh* Mutante mittels RNA Interferenz mit dem Ziel einer vollständigen *Ib(2)* bHLH Nullmutante

Aufgrund der vermuteten redundanten Funktionen der 4 *Ib(2)* bHLH Transkriptionsfaktoren (Abb. 8, vergleiche auch Wang et al., 2007) ist es zur Untersuchung dieser Faktoren notwendig eine vollständige Nullmutante zu generieren. Zum Erreichen dieses Ziels sollte in der *3xbhlh* Mutante das *BHLH38* Gen mittels RNA Interferenz posttranskriptionell ausgeschaltet werden. Dazu wurde eine artifizielle miRNA durch gerichtete PCR Mutagenese aus dem nativen mikroRNA Vorläufer miR319a amplifiziert, die sich dann gegen *BHLH38* richtet. miR319a reguliert natürlicherweise TCP Transkriptionsfaktoren, die für das Blattwachstum eine wichtige Rolle spielen (Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003) und wurde bereits mehrmals erfolgreich durch PCR Mutagenese verändert und zum Ausschalten verschiedenster Transkripte verwendet (Liu et al., 2009; Schwab et al., 2006; Warthmann et al., 2008). Als Template für die überlappende PCR Mutagenese zur Amplifikation der miRNA wurde hier das pRS300 Plasmid verwendet, welches den entsprechenden Vorläufer enthält (Schwab et al., 2006). Nach Fertigstellung des Konstruktes wurden *3xbhlh* Mutanten transformiert, dann wurden die T1 Samen auf Hygromycin selektiert (siehe 5.2.7.2) und 20 positive Pflanzen genotypisiert. In der T2 Generation fand erneut eine Hygromycinselektion und eine Genotypisierung statt aus der 11 positive unabhängige Linien hervorgingen. Bis zur Reinerbigkeit konnten 6 unabhängige Linien selektiert und per PCR genotypisiert werden. Bereits in der T2 zeigte die Pflanze FM172 stark retardiertes Blatt und Wurzelwachstum, krause Blattspreiten und eine sehr ausgeprägte Chlorose, die nach Transfer auf Erde innerhalb von 2-3 Tagen reversibel war (Abb. 11). Insgesamt zeigte die Pflanze einen zwergenhaften Wuchs während alle weiteren Linien phänotypisch unauffällig waren.



Abb. 11: Phänotyp der putativen *4xbhlh* Mutante nach 5 Wochen Wachstum auf Erde im Vergleich zum WT

4xbhlh und WT Pflanzen wurden bei Langtagbedingungen für 5 Wochen auf Erde kultiviert. Die Pflanze FM172 zeigt im Vergleich zum WT stark retardiertes Blatt und Längenwachstum, sowie krause Blattspreiten. Der Größenstandard entspricht 1cm.

Um bereits in der T2 zu überprüfen ob die amiRNA in dieser und in einigen anderen Linien zu einer Degradation der *BHLH38* mRNA geführt hat, wurden die Pflanzen FM162, FM163, FM164, FM172, FM178, FM180, FM182, FM183, FM194, FM196 und der WT für 14 Tage auf +Fe angezogen und dann für 3 Tage auf +Fe bzw. -Fe umgesetzt. Dann wurde die Hälfte der Wurzel jeder Pflanze als eine Probe gerntet und die Pflanzen zur Samenproduktion auf Erde umgesetzt. Die Expression von *FIT*, *FRO2*, *IRT1* und *BHLH38* wurde in Wurzeln mittels quantitativer Reverse Transkription-PCR untersucht. Die Expressionsanalyse zeigt für alle Pflanzen außer für FM172 und FM196

Ergebnisse

ähnliche Expressionsmuster der vier Gene (Abb. 12). In der Pflanze FM172 ist die *BHLH38* Expression im Vergleich zum WT um 62% verringert, allerdings zeigt sich kein Effekt auf die möglichen Zielgene *FRO2* und *IRT* oder den zentralen Regulator der Eisenmangelantwort *FIT*. Möglicherweise reicht hier die Menge an vorhandenem *BHLH38* aus um die Eisenmangelantwort zu gewährleisten. Die Pflanze FM196 dagegen zeigt reduzierte Transkriptwerte für *FIT*, *FRO2* und *IRT* ohne dass die *BHLH38* Expression stark vom WT abweicht. Insgesamt muss bei diesen Ergebnissen beachtet werden, dass nicht mit biologischen Replikaten gearbeitet werden konnte, da alle Pflanzen aufgrund der Segregation noch Individuen darstellen, das heißt einzelne Pflanzen sind und daher Fehlerbalken sowie eine statistische Auswertung nicht möglich waren (Abb. 12). Eine Untersuchung mit Replikaten sollte nach der Vermehrung in der T3 durchgeführt werden, allerdings zeigten die Pflanzen in dieser Generation keinen Phänotyp mehr und eine Verminderung der *BHLH38* Expression war auch nicht mehr messbar (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung könnte sein, dass die Expression der amiRNA in der T3 unterdrückt wurde und daher Phänotyp und Expressionswerte wieder WT Niveau zeigten. Da die Technik der amiRNA Interferenz trotz des molekularbiologischen Aufwands zukunftsweisend ist und sie hier, wenn auch nur kurzzeitig, zum Erfolg geführt hat, sollte mit mehreren amiRNAs gegen *BHLH38* eine dauerhafte Degradation der *BHLH38* mRNA erreicht werden können. Für weitere Versuche wurde auf die *3xbhlh* Mutante zurückgegriffen. Um die Rolle der bHLH Transkriptionsfaktoren in der Eisenmangelantwort bzw. im SA-Stressnetzwerk in der vorhandenen *3xbhlh* Mutante detaillierter untersuchen zu können, wurde dann eine weitere Technik herangezogen. Da die qRT-PCR Expressionsanalyse zwar eine sehr genaue Messung des Expressionsstatus zulässt, die Primer und Standards für jedes Gen aber einzeln entworfen werden müssen, wurde zur breiteren Expressionsanalyse ein Mikroarray Experiment durchgeführt (6.1.7).

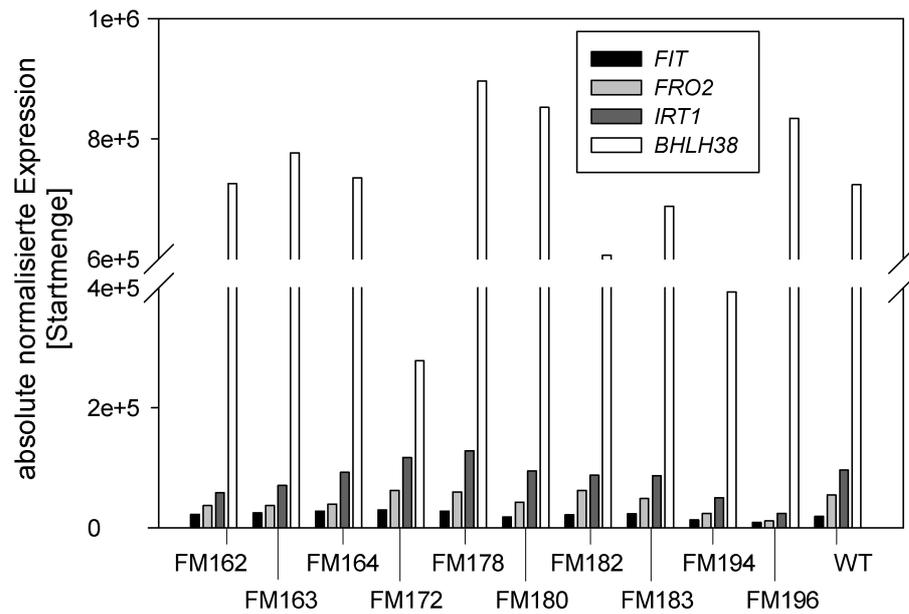


Abb. 12: Expressionsanalyse zur Überprüfung der *BHLH38* amiRNA Effizienz in T2 Pflanzen der *3xbhlh* Mutante

Putative *4xbhlh* Mutanten der T2 Generation und WT Pflanzen wurden für 7 Tage auf

Hoaglandagarplatten bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) angezogen und dann für 3 Tage auf Eisenmangelbedingungen (0 μ M FeNa-EDTA) oder ausreichende Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) umgesetzt. Die Expression von *FIT*, *FRO2*, *IRT1* und *BHLH38* wurde in Wurzeln mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. n=1.

6.1.7 Genomweite Genexpressionsstudie der *bhlh* Dreifachmutante im Vergleich zum WT mittels Mikroarray Chip

Um einen allgemeinen Überblick über die Veränderungen in der *3xbhlh* Mutante auf Expressionslevel zu erhalten, wurden die Mutante und der WT in einem Mikroarrayexperiment verglichen. Die Rolle der vier *Ib(2)* bHLH Transkriptionsfaktoren in der Eisenmangelantwort sollte dabei untersucht werden. Mit der Mikroarrayanalyse sollte endgültig geklärt werden ob, wie bereits durch die vorangegangenen Expressionsdaten und Eisen- sowie Reduktaseaktivitätsmessungen für die Eisenaufnahme gezeigt, die Anwesenheit von *BHLH38* ausreichend ist um auch die Eisenhomöostase aufrecht zu erhalten. Zusätzlich sollten durch mögliche Deregulation von bHLH Zielgenen in der Mikroarrayanalyse Hinweise über mögliche weitere Funktionen der bHLH Transkriptionsfaktoren *Ib(2)* in der Peripherie der Eisenhomöostase gesammelt werden, die Aufschluss über den Phänotyp der Mutante geben können. Aufgrund der Expression der vier *Ib(2)* bHLH Transkriptionsfaktoren in Blättern und Wurzeln ist es möglich, dass diese Transkriptionsfaktoren Langstreckensignale der Eisenhomöostase verarbeiten. Da *BHLH38/39* Ziele des salizylsäureinduzierbaren Transkriptionsfaktors *OBP3* sind und selbst durch Salizylat induziert werden können, ist ein möglicher Kandidat für ein solches Signal das Phytohormon Salizylat. Daher wurden für das Mikroarrayexperiment *3xbhlh* und WT Pflanzen für 6 Tage auf -Fe angezogen, dann für 6 Stunden auf Eisenmangelagar +SA (100 µM) oder ohne SA überführt und anschließend als ganzer Keimling geerntet. Dieses Anzuchtssystem hat den Vorteil, dass die Pflanzen als ganzer Keimling geerntet werden können und ermöglicht damit einen Überblick über das Blatt- und Wurzeltranskriptom in einer einzigen Probe. Der mehrtägige Eisenmangel stellt in diesem Versuchsaufbau sicher, dass die Eisenmangelantwort aktiv ist und eine 6 stündige Inkubation mit SA hat sich als wirkungsvolle Zeitspanne zur Induktion SA abhängiger Gene wie *PRI* herausgestellt (Johnson et al., 2003) und führt ebenfalls zur Induktion von *BHLH38/39* (Kang et al., 2003; Kang und Singh, 2000). Die Anzucht erfolgte dreimal in drei aufeinanderfolgenden Wochen um biologische Replikate zu erhalten (Abb. 13). Die von der Firma Atlas Biolabs gemessenen Rohdaten (gProcessedSignal) wurden zuerst mit dem 75%-Wert normalisiert (siehe 5.2.2.2) und mit der online Software NIA Array Analysis (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/index.html>) erneut normalisiert (siehe 5.2.2.2).

Ergebnisse

Dann wurden differentiell regulierte Gene im Vergleich zum WT gesucht, wobei ein fold-change Wert von 2,0 festgelegt wurde. Aus dieser Untersuchung gehen 4 Vergleiche hervor (*3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe, *3xbhlh* -Fe +SA gegen WT -Fe +SA, *3xbhlh* -Fe gegen *3xbhlh* -Fe +SA, WT -Fe gegen WT -Fe +SA), die einerseits die Rolle der 4 TF der Untergruppe Ib(2) in der Eisenhomöostase untersuchen und andererseits den Zusammenhang mit dem Salizylsäurenetzwerk herstellen. Im folgenden Abschnitt sollen zuerst nur die Ergebnisse im unmittelbaren Zusammenhang der Eisenhomöostase ohne Einfluss der Salizylsäure (*3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe) betrachtet werden und dann im Abschnitt (Abb. 13) auf die Mikroarrayergebnisse mit dem Stresshormon eingegangen werden.

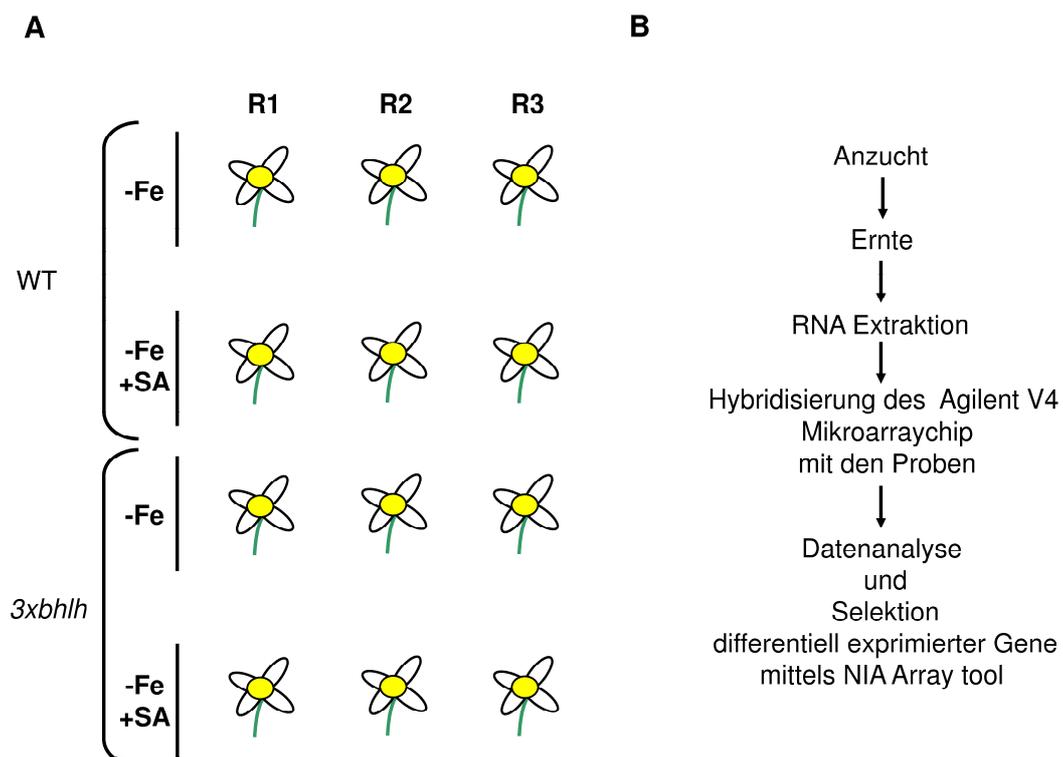


Abb. 13: Darstellung des experimentellen Arbeitsablaufs

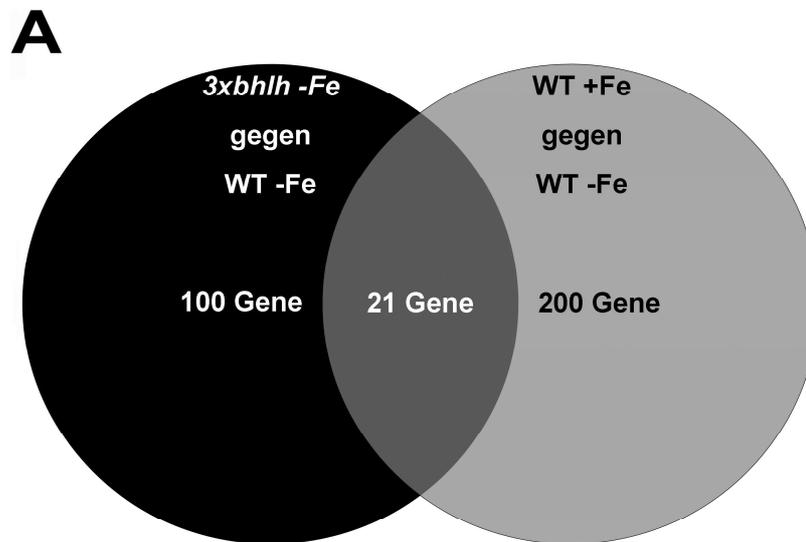
A) Planung des Mikroarray Experiments mit 3 biologischen Replikaten (R1 bis R3). WT und *3xbhlh* Keimlinge wurden bei -Fe angezogen, dann mit SA (100µM) behandelt und anschließend zur Verwendung im Mikroarray geerntet. **B)** Ablaufschema des Mikroarrays von der Anzucht bis zur Datenanalyse.

6.1.7.1 Differentiell regulierte Eisenmarker in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum WT

Um die Mutante auf Transkriptebene zu charakterisieren, wurde per Mikroarrayanalyse mit einem Agilent V4 Chip getestet ob andere Eisenmarkergene, als die bereits getesteten (Abb. 8), in der *3xbhlh* Mutante bei –Fe dereguliert sind. Damit sollte einerseits bestätigt werden, dass die *3xbhlh* Mutante nicht unter einer Deregulation der Eisenaufnahme leidet und andererseits überprüft werden, ob weitere Gene der Eisenhomöostase veränderte Expressionsmuster zeigen. Insgesamt wurden 121 Gene gefunden, die bei Eisenmangel in der Mutante anders reguliert sind als im WT, davon sind 75 in der Mutante im Vergleich zum WT hochreguliert und 46 herunter reguliert (siehe Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe). Diese 121 Gene wurden mit einer Liste von 221 stabilen Eisenmarkergenen verglichen (A), die in dieser Arbeitsgruppe in einem weiteren Mikroarrayexperiment mittels Affymetrixchip mit denselben Wachstumsparametern als WT Kontrolle erstellt worden war (WT +Fe gegen WT –Fe), um die *ein3eill* Mutante zu charakterisieren (Lingam et al., 2011; Bauer und Blondet, 2011). Die Schnittmenge aus beiden Listen enthält 21 im WT eisenabhängig exprimierte Gene, die bei Eisenmangel in der Mutante dereguliert sind (B). Die Differenzmenge der Gene, die nur bei Eisenmangel in der Mutante differentiell reguliert sind, enthält 100 Gene, während die Differenzmenge des WT 200 Gene umfasst (A). Die Teilmenge der 21 Gene, die in der *3xbhlh* gegenüber dem WT herunter reguliert (graugrün markiert) sind, enthält sowohl 4 Gene die im WT bei –Fe induziert (grün markiert) werden, als auch 6 Gene, die im WT normalerweise nur unter ausreichender Eisenversorgung stärker exprimiert (blau markiert) werden (B). Die Abbildung zeigt, dass *F21M12.13*, *NYC1*, *T9J22.17*, *T28M21.8*, *T1B8.13* und *CHL* die bei +Fe im WT induziert sind, in der Mutante bei –Fe herunter reguliert werden, allerdings stärker als das im WT bei –Fe der Fall ist. Im WT ist die Repression von z.B. *CHL* für die Pflanze sinnvoll, da das Lipocalin CHL im Thylakoidlumen gegen reaktive Sauerstoffspezies wirkt, um Membranlipide vor Peroxidationsreaktionen zu schützen und dessen Aktivität wahrscheinlich auch eher dann benötigt wird, wenn ein höheres Eisenangebot auch zur vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt (Levesque-Tremblay et al., 2009). Ein weiteres Gen auf der Liste *T28M21.8* ist in der Lipocalin Mutante *til* differentiell exprimiert (Charron et al., 2008). Diese Säurephosphatase der HAD (Haloacid Dehalogenase) Familie ist wahrscheinlich ebenfalls im Zusammenhang mit

Ergebnisse

oxidativen Stress in der Signaltransduktion aktiv und zeigt in der *3xbhlh* bei Eisenmangel eine schwächere Expression als im WT. Die schwächere Expression beider Gene bei -Fe in der Mutante könnte bedeuten, dass die Mutante weniger oxidativen Stress verspürt. Zieht man diese Hypothese in Betracht, ist der geringere oxidative Stress allerdings nicht auf Unterschiede im Eisengehalt zurückzuführen, da keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante und WT bestehen (Abb. 9). Der durch Fe hervorgerufene oxidative Stress hängt allerdings auch von Eisentransport und Speicherform ab und möglicherweise bestehen hier Unterschiede zwischen Mutante und WT.



B

Die 21 Gene der Schnittmenge sind in **3xbhlh** hochreguliert bzw. in **3xbhlh** herunterreguliert und zeigen Induktion bei +Fe im WT bzw. bei -Fe im WT.

	Genlokus	Genname
3xbhlh ↓ gegenüber WT	At1g09750	F21M12.13
	At4g13250	NYC1
	At2g26500	T9J22.17
	At3g47860	CHL
	At2g39920	T28M21.8
	At2g33830	T1B8.13
3xbhlh ↑ gegenüber WT	At3g07720	MLP3.17
	At2g41240	BHLH100
	At3g56980	BHLH39
	At4g31940	CYP82C4
	At2g04050	F3L12.12
	At1g01060	LHY
	At3g02380	COL2
	At2g21640	F2G1.9
	At1g32900	GBSS1
	At2g15020	T15J14.6
	At1g12030	F12F1.10
	At4g00050	UNE10
	At3g12320	T2E22.34
	At2g46830	CCA1
	At4g31870	GPX

Abb. 14: Venn Diagramm und Vergleich zu zweifach deregulierten Genen in der 3xbhlh bei -Fe
 Das Venn Diagramm zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede der differentiell regulierten Gene in der 3xbhlh bei Eisenmangel im Vergleich zum WT zu diejenigen Genen die im WT eisenreguliert sind (A). Die Tabelle zeigt die 21 Gene der Schnittmenge des Venn Diagramms, die bei -Fe in der 3xbhlh Mutante im Vergleich zum WT herunterreguliert oder hochreguliert sind und deren Induktion bei +Fe im WT bzw. bei -Fe im WT (B).

Ergebnisse

Die in der Mutante herunter regulierten Gene (graugrün markiert), die im WT bei –Fe induziert werden (grün markiert) sind zum Studium der bHLH Genfunktionen besonders interessant. Da die fehlenden bHLHs als positive Regulatoren der Eisenmangelantwort gelten (Yuan et al., 2008) gibt diese Gengruppe Aufschluss darüber welche eisenmangelexprimierten Gene in der Mutante bei –Fe nicht mehr auf WT Niveau induziert werden und daher direkt oder indirekt abhängig von den Ib(2) bHLHs sein könnten. Unter den 4 Genen der Gruppe sind *BHLH39* und *BHLH100* und bestätigen damit erneut den Knock out in der Mutante. *BHLH101* ist in der Gruppe nicht vertreten, da es zwar in der Mutante ausgeschaltet ist, aber im WT nicht so stark exprimiert war, dass die statistische Auswertung eine Aufnahme in diese Gruppe zuließ. Von den beiden weiteren Gene dieser Gruppe *At4g31940 (CYP82C4)* und *At3g07720 (MLP3.17)* ist bekannt, dass sie durch Eisenmangel induziert werden (Colangelo und Guerinot, 2004; Buckhout et al., 2009; Ivanov et al., 2011). Mutmaßlich spielen diese Gene eine Rolle in der Eisenhomöostase der Pflanze, wobei die genaue Funktion noch aufgeklärt werden muss.

Die Gene der Schnittmenge (A,B und Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe \cap WT +Fe gegen WT -Fe Schnittmenge), die in der *3xbhlh* gegenüber dem WT hochreguliert sind, enthält die 11 folgenden Gene, *F3L12.12*, *LHY*, *COL2*, *F2G1.9*, *GBSS1*, *T15J14.6*, *F12F1.10*, *UNE10*, *T2E22.34*, *CCA1* und *GPX7*, die im WT bei –Fe induziert werden (B). Drei dieser Gene, der Transmembrantransporter der MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) Familie *F3L12.12* und die beiden unbekannt Proteine *T15J14.6* und *T2E22.34* sind nicht nur in der *3xbhlh* dereguliert, sie zeigen auch in einer Studie über die Ethylensignaldoppelmutante *ein3/eil1* eine signifikant schwächere Expression als im WT (Lingam et al., 2011). Ein Gen, das mit der Eisenhomöostase in Zusammenhang gebracht wird und das in der *3xbhlh* Mutante bei –Fe signifikant induziert wird, ist *F12F1.10*. Obwohl das Protein und seine Funktion unbekannt sind wurde das Protein in Blättern als eisenmangelinduziert beschrieben (Ivanov et al., 2011). In Koexpressionsnetzwerkstudien mittels ATTED Online Software wurde gezeigt, dass das Gen mit Schwefelassimilations und Schwefelmangelgenen bei Eisenmangel koexprimiert ist (Ivanov et al., 2011). Daher kann man annehmen, dass Eisenmangel auch die Schwefelhomöostase in der Pflanze beeinflusst und umgekehrt, da viele schwefelmangelinduzierte Gene durch das ethylenabhängig regulierte EIN3 reguliert werden (Maruyama-Nakashita et al., 2006), dass auch mit FIT interagiert (Lingam et al., 2011).

Ergebnisse

Zwei weitere hoch regulierte Gene dieser Gruppe *LHY* und *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) codieren für MYB Transkriptionsfaktoren, die den Morgenkreislauf der inneren Uhr bilden. *CCA1* funktioniert in der inneren Uhr synergetisch mit *LHY*. Die innere Uhr kontrolliert allgemein viele Stoffwechsel- und Entwicklungsvorgänge sowie auch die Physiologie der Pflanze in Abhängigkeit der Tageszeit, die anhand der Photorezeptoren wahrgenommen wird. Unter diese Kontrolle fallen auch Gene der Eisenhomöostase, wie bereits 2003 von Vert et al. mit der Entdeckung aufgezeigt wurde, dass *IRT1* und *FRO2* Transkripte bei ausreichender Eisenversorgung spezifisch während des Tages akkumulieren. Ob die *3xbhlh* Mutante tatsächlich unter einer Deregulation der inneren Uhr leidet, kann ohne genauere Untersuchungen in diesem Zusammenhang nicht eindeutig geklärt werden, ausschließen kann man allerdings einen Unterschied der auf die Erntezeitpunkte der Proben für die Mikroarrayanalyse zurückgeht, da hier exakt zur selben Uhrzeit geerntet wurde. Insgesamt sind die, bei -Fe in der Mutante, signifikant stärker exprimierten Gene eine heterogene Gruppe die zeigt, dass keine klassischen Eisenaufnahme, Speicherung oder Transportgene in der *3xbhlh* induziert sind, allerdings signifikante Unterschiede zum WT bestehen, die Hinweise auf bisher unerforschte Aspekte der Eisenhomöostase und der Funktion der bHLHs geben können.

Die *3xbhlh* Differenzmenge (A und Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap WT +Fe gegen WT -Fe Differenzmenge) enthält 100 Gene. Darunter befindet sich *TIC* (*TIME FOR COFFE*), von dem man annimmt, dass es im WT eine Rolle für die zentralen tageszeitlichen Oszillationen der inneren Uhr, speziell am Morgen, spielt (Más, 2005), aber auch Bedeutung in der Eisenhomöostase hat. *TIC* reprimiert bei -Fe Bedingungen Gene, die bei hohen Eisenkonzentrationen aktiv werden, wie z.B. *FER1*, wobei Licht- und Dunkelzyklen benötigt werden (Duc et al., 2009). Allgemein wird angenommen, dass Pflanzen solange sie keinem Eisenüberangebot ausgesetzt sind, die Eisenhomöostase teilweise durch die innere Uhr regulieren. Interessanterweise nimmt *TIC* dabei unabhängig von der Eisenversorgung keinen Einfluss auf die Eisenaufnahmegene *IRT1* und *FRO2*, was in *tic* Mutanten bestätigt wurde, die einen chlorotischen Phänotyp besitzen, der durch äußerliche Zugabe von Eisen gerettet werden kann (Duc et al., 2009).

Ein weiteres Gen der Differenzmenge *COBL6* (*COBRA-LIKE PROTEIN 6 PRECURSOR*), das bei Eisenmangel in der Mutante differentiell reguliert ist, codiert für eine putative Phytochelatinsynthase. Das Gen ist in der Mutante bei Eisenmangel schwächer exprimiert als im WT, wobei es nicht in der Schnittmenge vorkommt, weil es

im WT in jenem Mikroarrayexperiment zur Erstellung der Eisenmarkergerne nicht eisenreguliert war. Im für diese Arbeit durchgeführten Array zeigt es allerdings eine Deregulation bei –Fe in der *3xbhlh* Mutante und ist ebenfalls in Mikroarrayexperimenten anderer Forscher in Keimlingswurzeln nach 48h bzw. 72h Eisenmangel stark induziert (siehe www.genevestigator.com, Long TA et al./ Benfey PN, Experiment ID: AT-00286.GEO). Daher wir im Folgenden für die hier durchgeführten Versuche davon ausgegangen, dass *COBL6* in Keimlingen im späten Verlauf des Eisenmangels induziert wird. *COBL6* und die zuvor beschriebenen Gene *CYP82C4* und *MPL3.17* sind bei –Fe auch in der *fit* Mutante reprimiert (Colangelo und Guerinot, 2004). Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass die *3xbhlh* Mutante nicht unter einer Deregulation der Eisenaufnahme leidet, aber es konnte gezeigt werden dass vor allem Gene mit bisher unerforschter Funktion in der Eisenhomöostase, die auch in anderen Eisenhomöostasemutanten dereguliert sind, veränderte Expressionsmuster zeigen. Die Erforschung dieser Gene bietet die Möglichkeit die weitestgehend unbekannt Funktionen der bHLH Untergruppe Ib(2) Transkriptionsfaktoren zu entschlüsseln.

6.1.8 Genexpressionsstudien der Eisenhomöostase im Kontext des Salizylsäurenetzwerks im WT und der *3xbhlh* Mutante

Da *BHLH38/39* als Ziele des salizylsäureinduzierbaren Transkriptionsfaktors *OBP3* gelten und selbst durch SA induzierbar sind (Kang und Singh, 2000; Kang et al., 2003), während das teilweise zu SA antagonistisch wirkende JA (Doherty und Selvendrant, 1988; Pena-Cortes et al., 1993) *FRO2* und *IRT1* stark negativ reguliert (siehe 7.12 und Maurer et al., 2011), sollte überprüft werden ob die Eisenmangelantwort im WT möglicherweise über *OBP3* und *BHLH38* bzw. *BHLH39* von SA moduliert wird und das Fehlen von *BHLH39* in der Mutante Einfluss darauf hat. Dazu wurden *3xbhlh* Mutanten und WT Pflanzen für 6 Tage bei +Fe und –Fe angezogen und anschließend für 6 Stunden auf +Fe oder -Fe Hoaglandagarplatten jeweils mit und ohne Salizylat überführt und anschließend per qRT-PCR untersucht (Abb. 15). Für die Analyse wurden im Rahmen dieser Arbeit spezielle Primer und Standards für *PR-1* (*PATHOGENESIS-RELATED GEN1*), dass allgemein als Markergen für die SA Behandlung dient und für *OBP3* erstellt. Für *OBP3* und *BHLH38* soll gezeigt werden, ob durch SA Behandlung in dem hier verwendeten Anzuchtsystem die bereits publizierte verstärkte Expression erreicht

Ergebnisse

werden kann und ob diese Reaktion von der Eisenversorgung abhängig ist (Kang und Singh, 2000; Kang et al., 2003). Anschließend wurde dann getestet, ob die putativen Zielgene von *BHLH38/39* nämlich *FRO2* und *IRT1* sowie *FIT* auf SA reagieren und ob die Reaktion in Mutante und WT unterschiedlich ausfällt (Abb. 16). Die Expressionsanalyse für *PR-1*, *OBP3* und *BHLH38* ergab, dass in WT und Mutante *PR-1* wie erwartet nur unter Einfluss von SA exprimiert wird (Abb. 15). Damit wird die erfolgreiche Behandlung mit SA bestätigt. Im WT lässt sich für *PR1* eine eisenmangelabhängige stärkere Expression bei +SA erkennen, die in der Mutante nicht zu erkennen ist. Vergleicht man die *PR-1* Expression in Mutante und WT, ist die Expression in der Mutante bei beiden Eisenbedingungen signifikant schwächer. Dieser Effekt wurde bei 5 von 7 durchgeführten Experimenten beobachtet. Ein solcher Effekt könnte damit zusammenhängen, dass in der Mutante generelle Stresssignale dereguliert sind, die mit dem SA Netzwerk in Zusammenhang stehen. Es wäre möglich, dass die Anwesenheit von *bHLH38/39* positive Effekte auf das SA regulierte Stressnetzwerk hat. *OBP3* zeigt im WT eine eisenmangelabhängige Induktion und ist in Mutante und WT bei +Fe und -Fe durch SA induzierbar (Abb. 15). Interessant ist, ob die *BHLH38* Expression mit diesen Werten korreliert, was ein Hinweis darauf wäre, dass SA über *OBP3* als positives Signal wirkt und damit auch Einfluss auf die Eisenmangelantwort haben könnte. Die *BHLH38* Expression zeigt mit und ohne Zugabe von SA in WT und Mutante bei -Fe eine Induktion (Abb. 15). Das heißt, die Eisenmangelsignalisierung scheint durch SA sowohl im WT als auch in der Mutante nicht beeinträchtigt. Da *BHLH38* im WT bei +Fe durch SA induziert wird, bestätigen sich auch die von Kang und Singh 2000 und Kang et al. 2003 publizierte SA abhängige Induzierbarkeit von *BHLH38*, die nur unter +Fe Bedingungen im WT untersucht wurde. Wenn auch signifikant, ist dieser Stimulus dennoch wesentlich schwächer als die Induktion über das bisher unbekannte Eisenmangelsignal, was erklären könnte warum beim Zusammentreffen beider Signale (+SA -Fe) im WT die *BHLH38* Expression zwar stärker ist als ohne SA, allerdings keinen signifikanten Unterschied ausmacht. In der Mutante lässt sich dagegen eine signifikante SA vermittelte *BHLH38* Induktion nur unter Eisenmangel messen, möglicherweise deshalb, weil in der Mutante bereits die Grundexpression im Vergleich zum WT verändert ist (vergleiche Abb. 7AB und Abb. 8A). Ausgehend von den WT Ergebnissen für *BHLH38* lässt sich nur für +Fe Bedingungen schließen, dass durch eine SA vermittelte stärkere *OBP3* Transkription auch die Expression des *bHLH* Transkriptionsfaktors erhöht wird. Um den Effekt auf die Eisenmangelantwort zu testen

Ergebnisse

wurde die Expression von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* unter Einfluss von SA untersucht (Abb. 16).

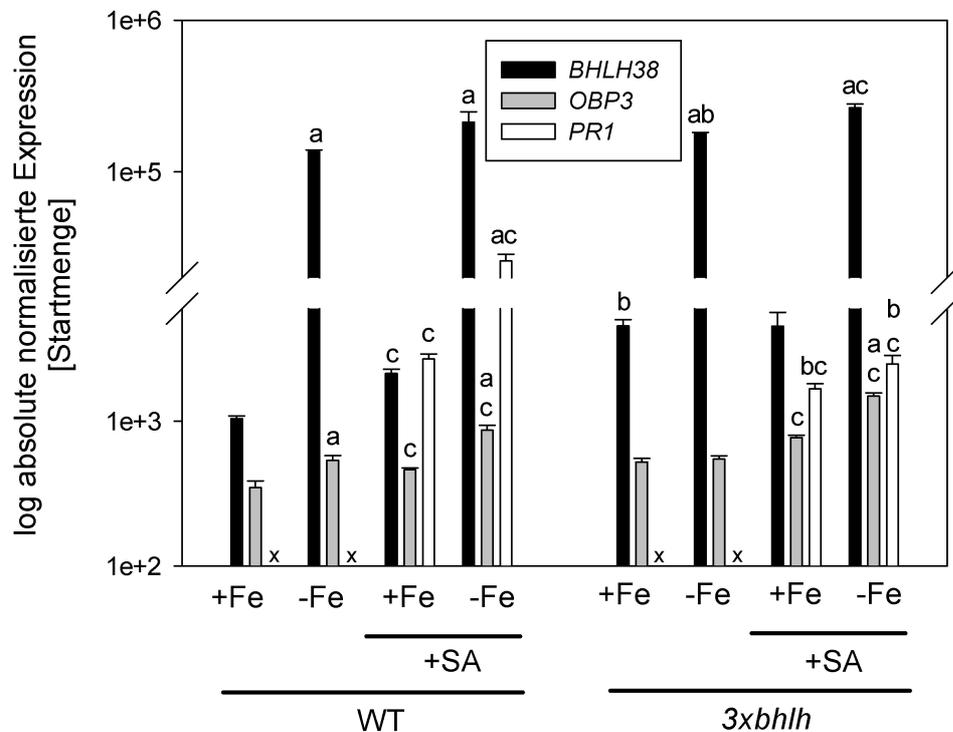


Abb. 15: Expressionsanalyse der Gene *BHLH38*, *OBP3* und *PR1* in der *3xbhlh* Mutante unter Einfluss von Salizylat

3xbhlh Mutanten und WT Pflanzen wurden für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei Eisenmangelbedingungen (0 μM FeNa-EDTA) und ausreichender Eisenversorgung (50 μM FeNa-EDTA) angezogen und anschließend für 6 Stunden auf 0 μM FeNa-EDTA oder 50 μM FeNa-EDTA Hoaglandagarplatten jeweils mit und ohne Salizylat (100 μM) überführt. Die Expression von *BHLH38*, *OBP3* und *PR1* wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, $n=2$. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen +Fe und -Fe Bedingungen eines Genotyps sind mit "a", zwischen der Mutante und dem WT bei gleicher Bedingung sind mit "b" und zwischen +SA und -SA Bedingungen eines Genotyps bei gleicher Eisenversorgung sind mit "c" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

Es sollte geklärt werden, ob die zentralen Eisenmangelantwortgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* durch SA induzierbar sind und ob in der Mutante aufgrund der fehlenden bHLH Transkriptionsfaktoren eine andere Reaktion beobachtet werden kann, die Aufschluss

Ergebnisse

über die Rolle der bHLH Proteine in der Eisenmangelantwort bzw. im SA-Stressnetzwerk gibt (Abb. 16). Alle drei Gene zeigen sowohl bei Behandlung mit SA, als auch ohne, im WT und der Mutante die Eisenmangelinduktion. Es lässt sich allerdings keine stärkere Induktion der SA-behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Proben ausmachen und generell zeigt keiner der verglichenen Werte signifikante Unterschiede zwischen Mutante und WT und legt damit die Vermutung nah, dass SA die Eisenmangelantwort auf Transkriptlevel nicht beeinflusst. Um diese These zu untermauern wurde im nächsten Abschnitt in SA-Netzwerkmutanten untersucht ob die Eisenmangelgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* sowie *BHLH38* und *BHLH39* Expressionsunterschiede zum WT aufzeigen.

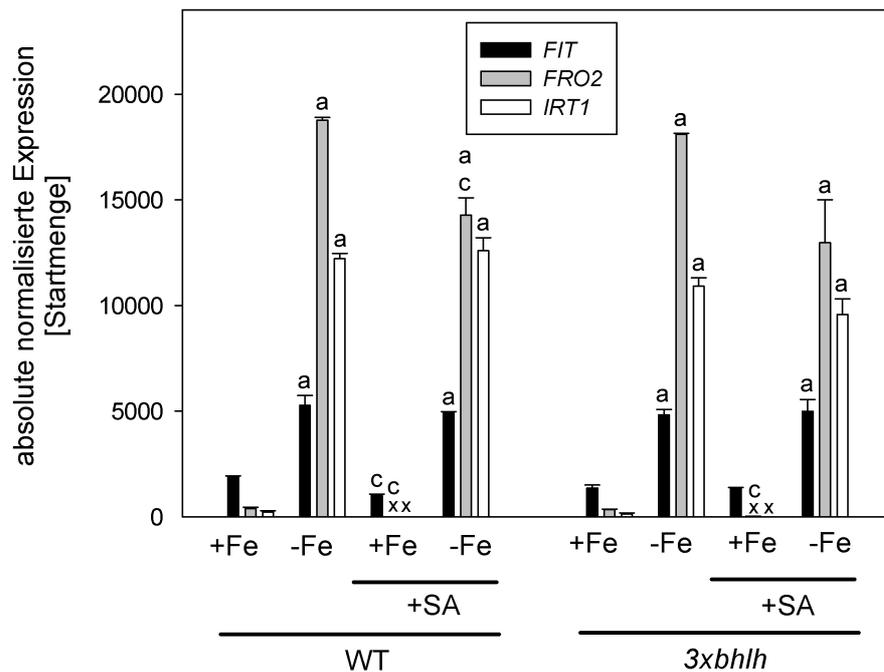


Abb. 16: Expressionsanalyse der Eisenmangelantwortgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* in der *3xbhlh* Mutante unter Einfluss von Salizylat

3xbhlh Mutanten und WT Pflanzen wurden für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei Eisenmangelbedingungen (0 μ M FeNa-EDTA) und ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) angezogen und anschließend für 6 Stunden auf 0 μ M FeNa-EDTA oder 50 μ M FeNa-EDTA Hoaglandagarplatten jeweils mit Salizylat (100 μ M, bezeichnet als "+SA") bzw. ohne überführt. Die Expression von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen +Fe und -Fe Bedingungen eines Genotyps sind mit "a" und zwischen +SA und -SA Bedingungen eines Genotyps bei gleicher Eisenversorgung sind mit "c" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Mutante und dem WT bei gleicher Bedingung festgestellt werden.

6.1.8.1 Genexpressionsstudien von Eisenhomöostasegenen in den SA-Netzwerkmutanten *npr1*, *NahG* und *sid2* im Vergleich zum WT

Um die Schlussfolgerung aus den vorangegangenen Experimenten (siehe 6.1.8) zu unterstützen und zu prüfen, ob das Salizylatnetzwerk die Induktion der Eisenmangelantwort auf Transkriptlevel tatsächlich nicht beeinflusst, wurde mit den SA-Netzwerkmutanten *npr1*, *NahG* und *sid2* getestet ob die Eisenmangelgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* sowie *BHLH38* und *BHLH39* Expressionsunterschiede zum WT aufzeigen.

Ergebnisse

Die Mutanten wurden so ausgewählt, dass in jeder Mutante ein anderer Teil des Salizylatnetzwerks betroffen ist. In *sid2* Pflanzen ist die Biosynthese betroffen, da die Umsetzung von Chorismat aus dem Shikimatweg zu Isochorismat fehlt (Lu, 2009; Nawrath und Métraux, 1999; Wildermuth et al., 2001), während in NahG Pflanzen die bakterielle SA Hydroxylase nahG SA zu inaktivem Katechol umsetzt, wodurch SA nicht akkumulieren kann (Durrant und Dong, 2004). In der *npr1* Mutante ist die Signaltransduktion zur Aktivierung der PR Gene eingeschränkt (Pieterse und Van Loon, 2004). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen dieser Mutanten im Vergleich zum WT zeigen dass *BHLH38/39* in allen SA Mutanten bei Eisenmangel eine Induktion der Transkription auf WT Niveau zeigen (Abb. 17A). Vergleicht man die Expressionswerte der Mutanten mit denen des WT bei gleicher Bedingung, können für *BHLH38/39* keine signifikanten Unterschiede zum WT festgestellt werden. Daher ist ein vollständig intaktes SA Netzwerk zumindest für die eisenmangelabhängige Induktion der beiden Gene wahrscheinlich nicht notwendig.

Die Gene *FRO2* und *IRT1* der Eisenmangelantwort zeigen in allen SA Mutanten wie auch im WT bei Eisenmangel eine signifikante Steigerung der Transkripte, während FIT ebenfalls induziert wird, allerdings ist diese Erhöhung weder im WT noch in den Mutanten signifikant (Abb. 17B). Vergleicht man die Expressionswerte der Mutanten mit denen des WT bei gleicher Bedingung, kann nur für *IRT1* in der *npr1* Mutante ein Unterschied festgestellt werden. Dort ist die *IRT1* Expression bei +Fe signifikant höher als im WT. Allerdings ist eine starke Deregulation der Eisenaufnahme unwahrscheinlich, da kein anderes Gen der Eisenmangelantwort betroffen scheint.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen mit den SA Mutanten geschlossen werden, dass die Induktion der Eisenmangelantwortgene *FRO2* und *IRT1*, über *BHLH38/39* zusammen mit FIT nicht von einem intakten SA Netzwerk abhängig ist. Das bestätigt, dass SA die Eisenmangelantwort auf Transkriptlevel nicht beeinflusst. Da aber aufgrund der reduzierten *PR1* Expression bei Eisenmangel in der *3xbhlh* Mutante Hinweise bestehen (Abb. 15), dass die bHLHs noch weitere bisher unbekannte Funktionen besitzen, die über die Eisenmangelantwort hinausgehen und mit dem SA Netzwerk in Zusammenhang stehen, wurde zusätzlich eine weitere Technik zur Untersuchung dieser Thematik herangezogen. Da die qRT-PCR Expressionsanalyse zwar eine sehr genaue Messung des Expressionsstatus zulässt, die Primer und Standards für jedes Gen aber einzeln entworfen werden müssen, wurde zur breiteren Expressionsanalyse ein Mikroarray Experiment durchgeführt dessen Ablauf und Aufbau bereits in Abschnitt 6.1.7

Ergebnisse

beschrieben wurde und dessen Ergebnisse in Abschnitt 6.1.8.2 bis 6.1.8.4 dargestellt werden.

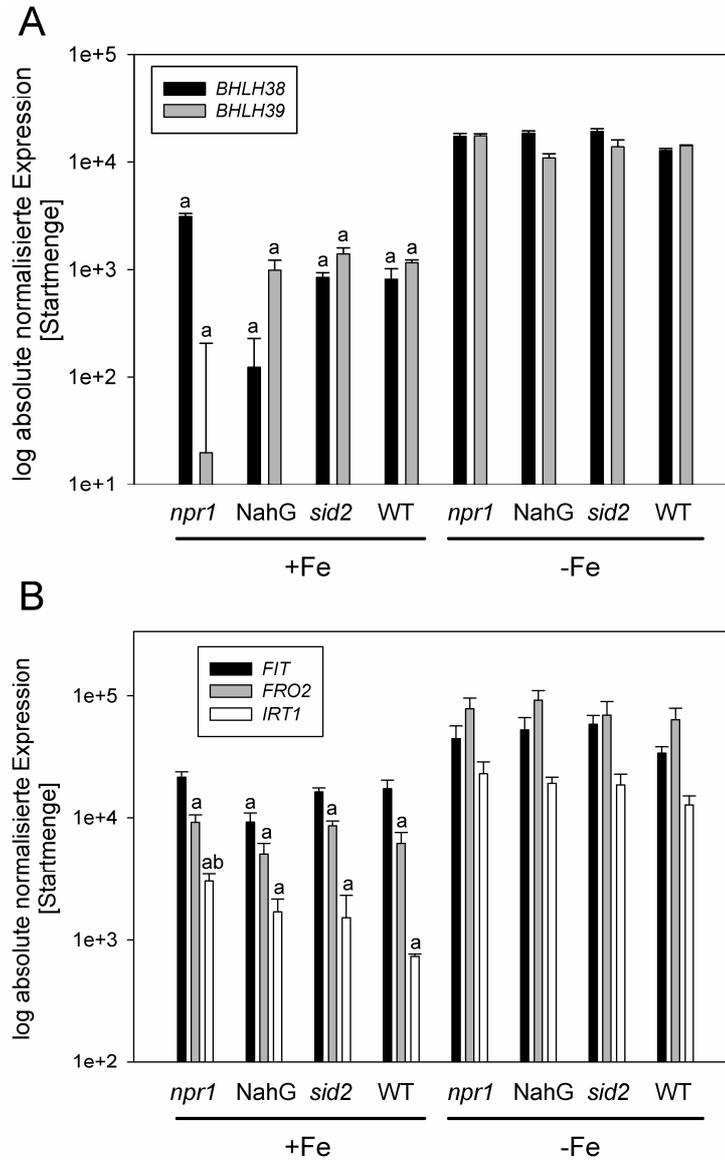


Abb. 17: Expressionsanalyse der Eisenmangelgene *BHLH38*, *BHLH39*, *FIT*, *FRO2* und *IRT1* in Mutanten mit verändertem Salizylatnetzwerk

npr1, *NahG* und *sid2* Mutanten sowie WT Pflanzen wurden für 11 Tage auf Hoaglandagarplatten bei Eisenmangelbedingungen (0 μM FeNa-EDTA) und ausreichender Eisenversorgung (50 μM FeNa-EDTA) angezogen und anschließend das Wurzelmaterial geerntet. Die Expression von *BHLH38*, *BHLH39* (A) und *FIT*, *FRO2* und *IRT1* (B) wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen +Fe und -Fe Bedingungen eines Genotyps sind mit "a" und Unterschiede zwischen Mutanten und WT bei gleicher Bedingung sind mit "b" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

6.1.8.2 Untersuchung differentiell exprimierter Eisenmangelgene in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum WT bei Eisenmangel unter Einfluss von SA

Um zu überprüfen ob die bHLH Untergruppe Ib(2) Effekte auf das SA regulierte Stressnetzwerk hat und in der *3xbhlh* dadurch die Expressionsmuster, der durch SA geregelten Gene, Unterschiede zum WT aufzeigen, wurde die Mutante auf Transkriptebene per Mikroarrayanalyse charakterisiert (siehe auch 6.1.7 und Abb. 13). Dazu wurden die 4 Vergleiche *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe, *3xbhlh* -Fe +SA gegen WT -Fe +SA, *3xbhlh* -Fe gegen *3xbhlh* -Fe +SA und WT -Fe gegen WT -Fe +SA zur Analyse herangezogen. Zuerst wurden die 121 Gene, die bei Eisenmangel in der Mutante anders reguliert sind als im WT (siehe Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe) in einem Venn Diagramm den 3900 Genen gegenübergestellt, die im WT bei Eisenmangel und durch SA reguliert werden (Abb. 18A). So können erste putative Zielgene der bHLHs die im WT SA reguliert sind gefunden werden. Die Schnittmenge enthält 49 Gene (Abb. 18B, Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap WT -Fe gegen WT -Fe +SA). Die enthaltenen Gene sind gleichzeitig bei Eisenmangel in der *3xbhlh* Mutante dereguliert und stehen durch ihre salizylsäureabhängige Regulation im WT mit dem SA Netzwerk in Zusammenhang. Die Gene der Schnittmenge sind abhängig von ihrer Regulation in die Gruppen I bis IV eingeteilt (Abb. 18B). Die Gene der Schnittmenge, die in der *3xbhlh* gegenüber dem WT herunter reguliert (graugrün markiert) sind, enthält sowohl 6 Gene die im WT bei -Fe induziert (blau markiert) werden (Gruppe I), als auch 11 Gene, die im WT salizylsäureabhängig induziert (rot markiert) werden (Gruppe II). In Gruppe I befindet sich auch *F21M12.13* (weiß markiert), ein Aspartyl Protease Homolog mit Endopeptidasefunktion, das bereits in der Schnittmenge in Abb. 14 enthalten war, das heißt, es handelt sich um ein gleichzeitig Eisen und SA reguliertes Gen, dass in der Mutante differentiell exprimiert wird. Das Gen wird in der Zellwand exprimiert, eine Rolle im Salizylsäurenetzwerk oder der Eisenhomöostase ist nicht bekannt. Eines der 6 Gene die im WT bei -Fe induziert werden heißt *TIC* und ist ein Regulator im Zusammenhang der inneren Uhr, dessen mögliche Bedeutung bereits erläutert wurde (siehe auch Absatz 6.1.7.1). Insgesamt gibt Gruppe I keine neuen Hinweise auf die Funktion der bHLHs im Salizylsäurenetzwerk.

Besonders interessant sind dagegen die Gene der Gruppe II, die in der Mutante reprimiert sind und im WT salizylsäureabhängig reguliert (rot markiert) werden (Abb.

Ergebnisse

18B), da hier abgelesen werden kann, ob die fehlenden bHLHs möglicherweise, wie durch die reduzierte *PR1* Expression vermutet, einen Effekt auf SA regulierte Gene haben können. Die Gruppe umfasst die 11 Gene *WRKY70*, *T11J7.5*, *MTE17.16*, *PR5*, *T4C9.130*, *F5F19.18*, *ARK1*, *tA32559_3702* (ähnlich zu β -Glukosidase ähnlichem Protein AT3G60140), *BP653910* (Ähnlichkeit mit Homolog zu Ferredoxin-1 Chloroplasten Vorläufer), *NP230685* und *TIB8.13* welches bereits in der Schnittmenge in Abb. 14 enthalten war. An dieser Gruppe lässt sich ablesen, dass Gene im Zusammenhang des SA Netzwerks in der Mutante bei -Fe dereguliert sind. Dabei ist besonders die genauere Betrachtung des Transkriptionsfaktors *WRKY70* und des Abwehrproteins *PR5* von Interesse. *WRKY70* ist ein negativer Regulator der Blattseneszenz, der durch reprimieren von bestimmten SA, JA und ET abhängigen Abwehrgenen die Blattreifung verzögert (Ulker et al., 2007) und selbst durch SA verstärkt exprimiert wird, während ET und JA bei seiner transkriptionellen Regulation wahrscheinlich keine Rolle spielen (Li et al., 2004; Ulker et al., 2007). Außerdem wird angenommen, dass *WRKY70* möglicherweise als Koaktivator der Gene *PR1*, *PR2*, und *PR5* der systemisch erworbenen Abwehr fungiert, der benötigt wird um *PR1* maximal zu exprimieren, allerdings ist der genaue Mechanismus bisher unbekannt (Li et al., 2004).. Als Koaktivator könnte eine allgemein schwächere Expression von *WRKY70* in der *3xbhlh* eine Veränderung des internen SA Netzwerks bedeuten, die mutmaßlich die geringere Expression von *PR1* in den qRT-PCR Experimenten und *PR5* im Mikroarrayexperiment erklärt. Das reprimierte *PR5* ist wie *PR1* auch ein Abwehrprotein, das durch verschiedene Pathogene und Stressreaktionen aktiviert wird und antifungale Wirkung besitzt. Da keine weiteren SA regulierten Gene in dieser Gruppe betroffen sind, kann man entweder annehmen, dass nur dieser spezielle Teilaspekt der Seneszenz und Pathogengene von den bHLHs positiv reguliert werden oder dass durch starke Redundanz weitere Funktionen in der *3xbhlh* durch die Anwesenheit des verbliebenen bHLHs intakt sind. Eine generelle Veränderung des internen Salizylsäurelevels ist wahrscheinlich auszuschließen, da die Expressionsdaten auf keine Deregulation der Salizylsäurebiosynthesegene hindeuten und die Anzahl betroffener Zielgene in diesem Fall wesentlich größer wäre.

Die Gene der Schnittmenge, die in der *3xbhlh* gegenüber dem WT hochreguliert (pink markiert) sind und im WT salizylsäureabhängig reguliert wird, enthalten sowohl 5 Gene die im WT bei -Fe induziert (blau markiert) werden (Gruppe IV), als auch 27 Gene, die im WT salizylsäureabhängig induziert (rot markiert) werden (Gruppe III, siehe Abb.

18B). In Gruppe III fallen zwei funktionelle Untergruppen auf. Die eine Gruppe enthält die Abwehrgene AT4G08875, das für ein defensinähnliches Protein kodiert und AT1G50180, das Pathogenabwehrprotein mit NB-ARC (Nukleotid bindend an Apaf1, R Proteine und CED4) Domäne (Martin et al., 2003). Die andere Gruppe enthält Gene der inneren Uhr oder solche, die von ihr abhängig reguliert werden. Zwei dieser Gene *LHY* und *CCA1*, die den Morgenkreislauf der inneren Uhr bilden, waren bereits zuvor als in der *3xbhlh* induziert beschrieben worden (siehe Absatz 6.1.7.1) und sind aufgrund ihrer Regulation durch SA im WT auch hier in der Schnittmenge enthalten. Interessant ist, dass noch weitere Gene im Zusammenhang der inneren Uhr in der *3xbhlh* induziert sind. Bei den Genen handelt es sich um *HYH*, *COL1* und *CGA1*. Für das zirkadian regulierte *CGA1* (*CYTOKININ RESPONSIVE GATA FACTOR 1* auch bekannt als *GATA22*) dessen Transkriptionsmaximum vier Stunden vor der subjektiven Dämmerung liegt, konnte in einer Expressionsstudie von Manfield et al. 2007 gezeigt werden, dass es mit *CCA1*, *LHY*, *COL1*, *COL2*, *HY5* und *HYH* koexprimiert wird und bestätigt damit die hier erhaltenen Ergebnisse. Die Induktion dieser Gene in der *3xbhlh* könnte ein Hinweis auf eine Deregelung der Zyklen der inneren Uhr sein, da allerdings für die bHLH Untergruppe Ib(2) keine Hinweise auf zyklische Expressionsmuster bestehen ist die putative Rolle dieser Gene in der inneren Uhr unklar. Insgesamt konnte die Analyse der Schnittmenge der Vergleiche *3xbhlh* –Fe gegen WT –Fe mit WT –Fe gegen WT –Fe +SA außerdem zeigen, dass die BHLHs sehr wahrscheinlich Einfluss auf die SA abhängigen Stress- und Abwehrgene *WRKY70* und *PR5* nehmen, die sich regulatorisch unterhalb von *NPR1* befinden und fügt sich damit auch in die Theorie ein, dass die reduzierte *PR1* Expression bei –Fe +SA in der *3xbhlh* Mutante auf das Fehlen der bHLHs zurückzuführen ist.

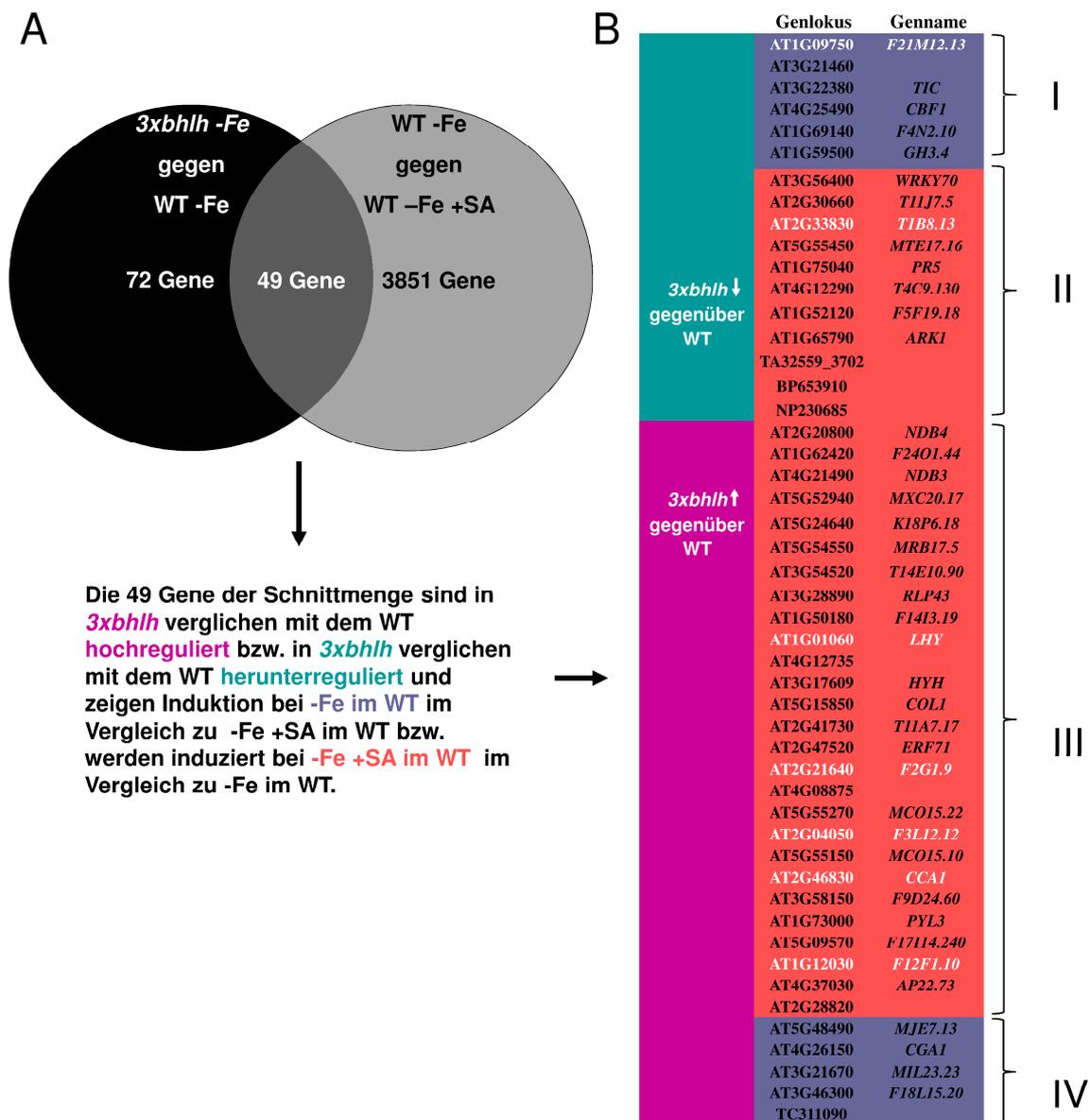


Abb. 18: Venn Diagramm zu zweifach deregulierten Genen in *3xbhlh* -Fe gegen WT-Fe und WT -Fe gegen WT-Fe +SA

Das Venn Diagramm zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede der differenziell regulierten Gene in der *3xbhlh* bei Eisenmangel im Vergleich zum WT zu denjenigen Genen die im WT bei -Fe +SA reguliert sind (A). Die Tabelle zeigt die 49 Gene der Schnittmenge des Venn Diagramms aus A, die in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum WT herunter reguliert oder hoch reguliert sind und deren Induktion bei -Fe im WT bzw. bei -Fe +SA im WT. Abhängig von ihrer Regulation sind die Gene in die Gruppen I bis IV eingeteilt. (B). Von diesen Genen sind diejenigen 7, die auch in der Schnittmenge in Abb. 14 zu finden sind, weiß markiert.

6.1.8.3 Untersuchung differentiell regulierter Gene in der *3xbhlh* Mutant bei Eisenmangel unter Einfluss von SA

Um mögliche Effekte der bHLH Untergruppe Ib(2) auf das SA regulierte Stressnetzwerk weiter zu untersuchen, sollten die zuvor gewonnen Mikroarraydaten, der im WT durch Eisenmangel und SA beeinflussten Gene mit den in der *3xbhlh* Mutante durch Eisenmangel und SA beeinflussten Genen verglichen werden. Dazu wurden zuerst die 121 Gene, die bei Eisenmangel in der Mutante anders reguliert sind als im WT (siehe Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe) in einem Venn Diagramm den 3823 Genen gegenübergestellt, die in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel und durch SA reguliert werden (Abb. 19A). Die Schnittmenge enthält 46 Gene (Abb. 19B, Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap *3xbhlh* -Fe gegen *3xbhlh* -Fe +SA). Die enthaltenen Gene sind gleichzeitig bei Eisenmangel in der *3xbhlh* Mutante dereguliert und stehen durch ihre salizylsäureabhängige Regulation mit dem SA Netzwerk in Zusammenhang. Um später einen Vergleich mit denen im WT durch SA regulierten Genen zu ermöglichen und zu untersuchen ob es Gene gibt, die in der Mutante durch SA anders reguliert werden als im WT, wurden die Gene die bereits in der Schnittmenge in Abb. 18 enthalten waren in Abb. 19B durch blaue Lettern hervorgehoben. Ein Vergleich der Regulation dieser hervorgehobenen Gene die jeweils in Mutante und WT -Fe +SA Analyse vorkommen, wird in Abb. 20 dargestellt. Alle Gene in schwarzer Schrift zeigen in der Mutante differentiell regulierte Gene im Zusammenhang von Eisenmangel und salizylsäurevermittelten Reaktionen, die nicht bereits in der WT Analyse in Abb. 18 vorkommen. Im Folgenden sollen zuerst diese neu hinzugekommenen Gene besprochen werden. Die Gene der Schnittmenge sind abhängig von ihrer Regulation in die Gruppen I bis IV eingeteilt (Abb. 19B). Die Gene der Schnittmenge, die bei -Fe in der *3xbhlh* gegenüber dem WT herunter reguliert (graugrün markiert) sind, enthält sowohl 2 Gene, die in der *3xbhlh* Mutante bei -Fe im Vergleich zu -Fe +SA Bedingungen induziert (orange markiert) werden (Gruppe I), als auch 13 Gene, die in der *3xbhlh* Mutante salizylsäureabhängig induziert (grau markiert) werden (Gruppe II).

In Gruppe I befinden sich die bereits in Abb. 18 vorhandenen Gene *AT3G21460* und *AT1G09750* (blau markiert). Diese Gene werden durch Eisenmangel in der Mutante induziert, allerdings signifikant schwächer als im WT. Ein Zusammenhang mit der Eisenhomöostase ist für diese Gene bisher nicht bekannt.

Ergebnisse

Die Gene der Gruppe II sind bei Eisenmangel in der Mutante schwächer exprimiert als im WT, werden aber gleichzeitig in der Mutante unter Einfluss von SA induziert. Die Gruppe umfasst die 10 bereits aus Abb. 18 bekannten Gene *WRKY70*, *PR5*, *ARK1*, *TIB8.13*, *T4C9.130*, *F5F19.18*, *tA32559_3702*, *NP230685*, *AT2G30660*, *AT5G55450* und die 3 Gene *AV562266*, *AT1G28190* und *AT4G06746*. Für keines der neu hinzugekommenen Gene ist eine Verbindung zur Eisenhomöostase bekannt.

Die Gene der Schnittmenge, die in der *3xbhlh* Mutante gegenüber dem WT hochreguliert (pink markiert) sind enthalten sowohl 19 Gene, die in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangelbedingungen im Vergleich zu -Fe +SA Bedingungen induziert sind (orange markiert) (Gruppe IV), als auch 12 Gene, die in der *3xbhlh* Mutante salizylsäureabhängig induziert (grau markiert) werden (Gruppe III, siehe Abb. 19B).

Gruppe IV umfasst die bereits in Abb. 18 gezeigten Gene *AT3G21670*, *AT3G46300*, *TC311090*, *AT4G26150*, *AT5G48490* (blau markiert) sowie die Gene *AT5G37990*, *AT1G77100*, *AT2G46800*, *AT3G02380*, *AT5G66740*, *AT5G42760*, *AT5G38000*, *AT5G37940*, *AT5G50270*, *AT2G01520*, *AT5G37970*, *AT2G15020*, *AT1G55960* und *AT1G02820*. Die Genexpression dieser Gruppe ist in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel im Vergleich zum WT induziert, scheint durch SA speziell in der Mutante aber negativ beeinflusst zu werden.

In Gruppe III befinden sich diejenigen Gene, die in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel gegenüber dem WT hochreguliert (pink markiert) sind und die gleichzeitig in der Mutante durch SA induziert werden (grau markiert). Gruppe III umfasst ausschließlich die bereits in Abb. 18 gezeigten Gene *AT3G54520*, *AT5G24640*, *AT3G28890*, *AT1G50180*, *AT4G12735*, *AT2G41730*, *AT2G47520*, *AT2G21640*, *AT2G04050*, *AT5G55150*, *AT3G58150* und *AT4G37030* (blau markiert).

In den Vennanalysen im WT ($WT -Fe \text{ gg } 3xbhlh -Fe \cap WT -Fe \text{ gg } WT -Fe +SA$, siehe Abb. 18) und der *3xbhlh* Mutante ($WT -Fe \text{ gg } 3xbhlh -Fe \cap 3xbhlh -Fe \text{ gg } 3xbhlh -Fe +SA$, siehe Abb. 19) scheinen die bHLHs und SA gegensätzliche Einflüsse auf die Gruppen I und III zu haben, da die Gene der Gruppe I durch SA reprimiert zu werden scheinen, während die bHLHs möglicherweise positiv auf deren Transkription wirken, Gruppe III zeigt eine umgekehrte Regulation in der die bHLHs negativ und SA positiv auf die Genexpression wirkt (Abb. 19).

Die Gruppen II und IV die Gene enthalten, die nicht ebenfalls im WT durch SA reguliert waren zeigen dagegen ein Regulation, die jeweils für SA und die bHLHs gleich gerichtet ist. Das heißt für Gruppe II scheint die Regulation, die sowohl von SA und als auch den

bHLHs ausgeht, positiv zu sein. Auf die Gene in Gruppe IV haben SA wie auch die bHLHs einen negativen Effekt.

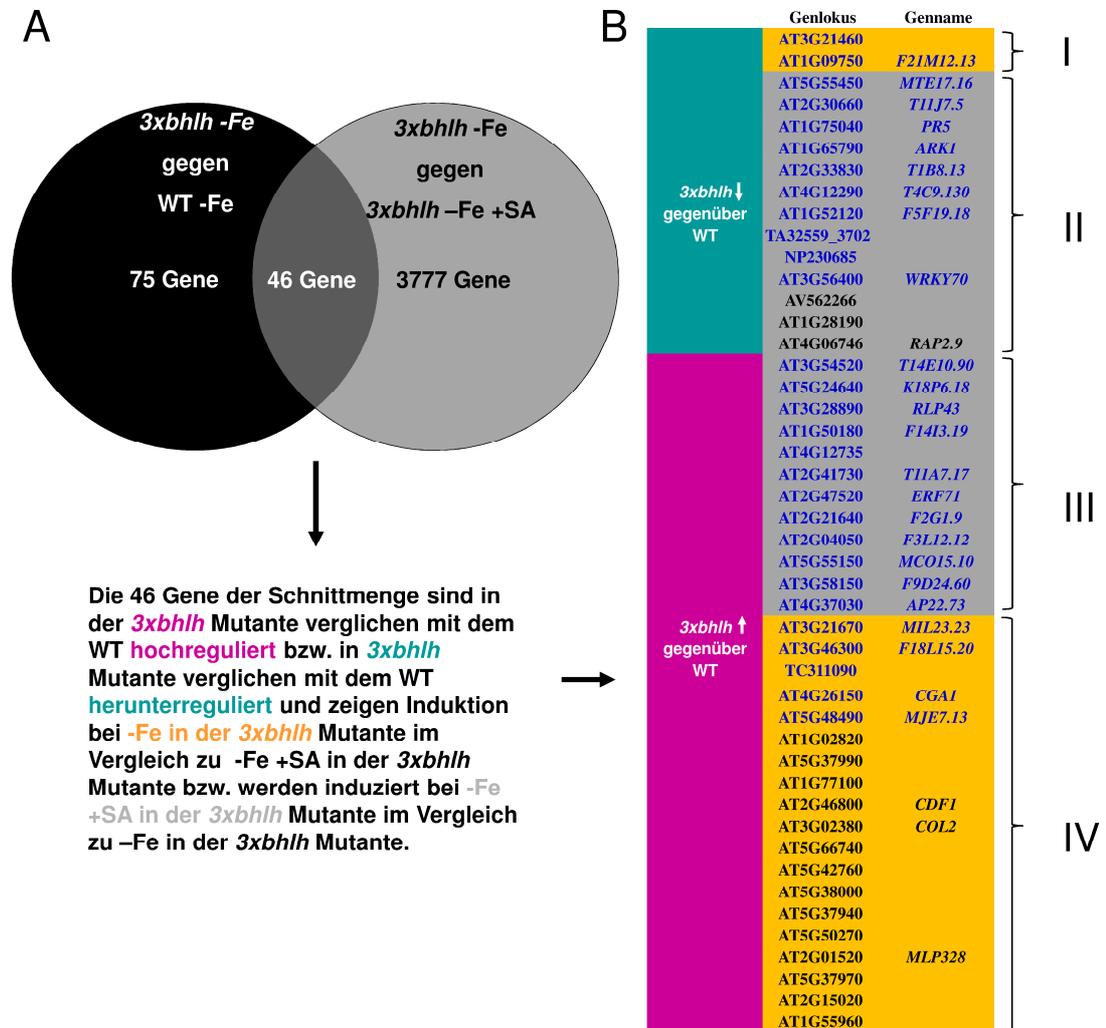


Abb. 19: Venn Diagramm zu zweifach deregulierten Genen in *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe und *3xbhlh* -Fe gegen *3xbhlh* -Fe +SA

Das Venn Diagramm zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede der differentiell regulierten Gene in der *3xbhlh* bei Eisenmangel im Vergleich zum WT zu denjenigen Genen die in der *3xbhlh* Mutante bei -Fe +SA reguliert sind (A). Die Tabelle zeigt die 46 Gene der Schnittmenge des Venn Diagramms aus A, die in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum WT herunterreguliert oder hochreguliert sind und deren Induktion bei -Fe in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zu -Fe +SA in der *3xbhlh* Mutante bzw. die Induktion der Gene bei -Fe +SA in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zu -Fe in der *3xbhlh* Mutante. Abhängig von ihrer Regulation sind die Gene in die Gruppen I bis IV eingeteilt. (B). Von diesen Genen sind diejenigen 29 Gene, die auch in der Schnittmenge in Abb. 18 zu finden sind, blau markiert.

6.1.8.4 Vergleich der Analysen eisenmangel- und SA-induzierbarer Gene in WT und *3xbhlh* Mutante

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Regulation SA abhängiger Gene in WT und *3xbhlh* Mutante herauszustellen, wurden in dieser Analyse die in den zwei vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Vergleiche *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap WT -Fe gegen WT -Fe +SA (siehe Abb. 18) und *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap WT -Fe gegen WT -Fe +SA (siehe Abb. 19) einander in einem Venn Diagramm gegenübergestellt (Abb. 20A). Die 29 Gene, die in beiden Schnittmengen vorhanden waren, werden hier im Bezug darauf verglichen, ob Sie im WT oder der *3xbhlh* Mutante entweder durch -Fe oder durch -Fe +SA Bedingungen induziert werden. Dadurch können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die bHLHs diese Gene regulieren und welcher Art die Regulation ist.

Die Gene der Gruppe I werden in WT und *3xbhlh* Mutante durch Eisenmangel induziert, während die Gene der Gruppe II salizylsäureabhängig induziert werden. Beide Gruppen sind in der *3xbhlh* Mutante bei -Fe schwächer exprimiert als im WT (graugrün markiert) (Abb. 20B). Bei der Gruppeneinteilung zeigen sich keine Unterschiede innerhalb dieser Schnittmengengene zwischen WT und *3xbhlh* Mutante. Gleiches gilt für die Gene, die in der Mutante bei -Fe stärker exprimiert sind als im WT (pink markiert), die sich ebenfalls in SA induzierbare Gene (Gruppe III) und -Fe induzierbare Gene (Gruppe IV) einteilen lassen. Die gleichförmige Regulation in beiden Genotypen zeigt an, dass das Fehlen der bHLH Transkriptionsfaktoren in der Mutante zwar zu einer signifikant veränderten Expression dieser Gene bei -Fe geführt hat, die grundlegende Transkriptionsregulation bei -Fe +SA allerdings scheinbar ohne die 3 fehlenden bHLHs der Untergruppe Ib(2) ablaufen kann oder alternativ könnte man davon ausgehen, dass das verbleibende *BHLH38* die Funktionen der anderen bHLHs übernommen hat.

Bestätigt wird diese Hypothese für alle bis auf 2 Gene durch den Vergleich der WT -Fe +SA mit den *3xbhlh* -Fe +SA Werten für alle Gene dieser Tabelle. Nur die beiden Gene At3g21460 und At1g52120 zeigen einen signifikant unterschiedlichen fold-change zwischen WT und Mutante beim direkten Vergleich *3xbhlh* -Fe +SA gegen WT -Fe +SA. Beide Gene sind im WT signifikant stärker exprimiert als in der Mutante (At3g21460 fold-change = 3,128; At1g52120 fold-change = 2,673). At3g21460 aus Gruppe I codiert für ein Glutatredoxin, At1g52120 aus Gruppe II stammt aus der

Ergebnisse

Proteinfamilie der mannosebindenden Lektine. Alle anderen Gene scheinen nur bei -Fe nicht aber unter Einfluss von SA abhängig von den Ib(2) bHLHs.

Die Schnittmenge aller signifikant unterschiedlich regulierte Gene der beiden Venn Vergleiche WT -Fe gegen *3xbhlh* -Fe \cap WT -Fe gg WT -Fe +SA und *3xbhlh* -Fe \cap *3xbhlh* -Fe gg *3xbhlh* -Fe +SA sind in Abb. 21 dargestellt.

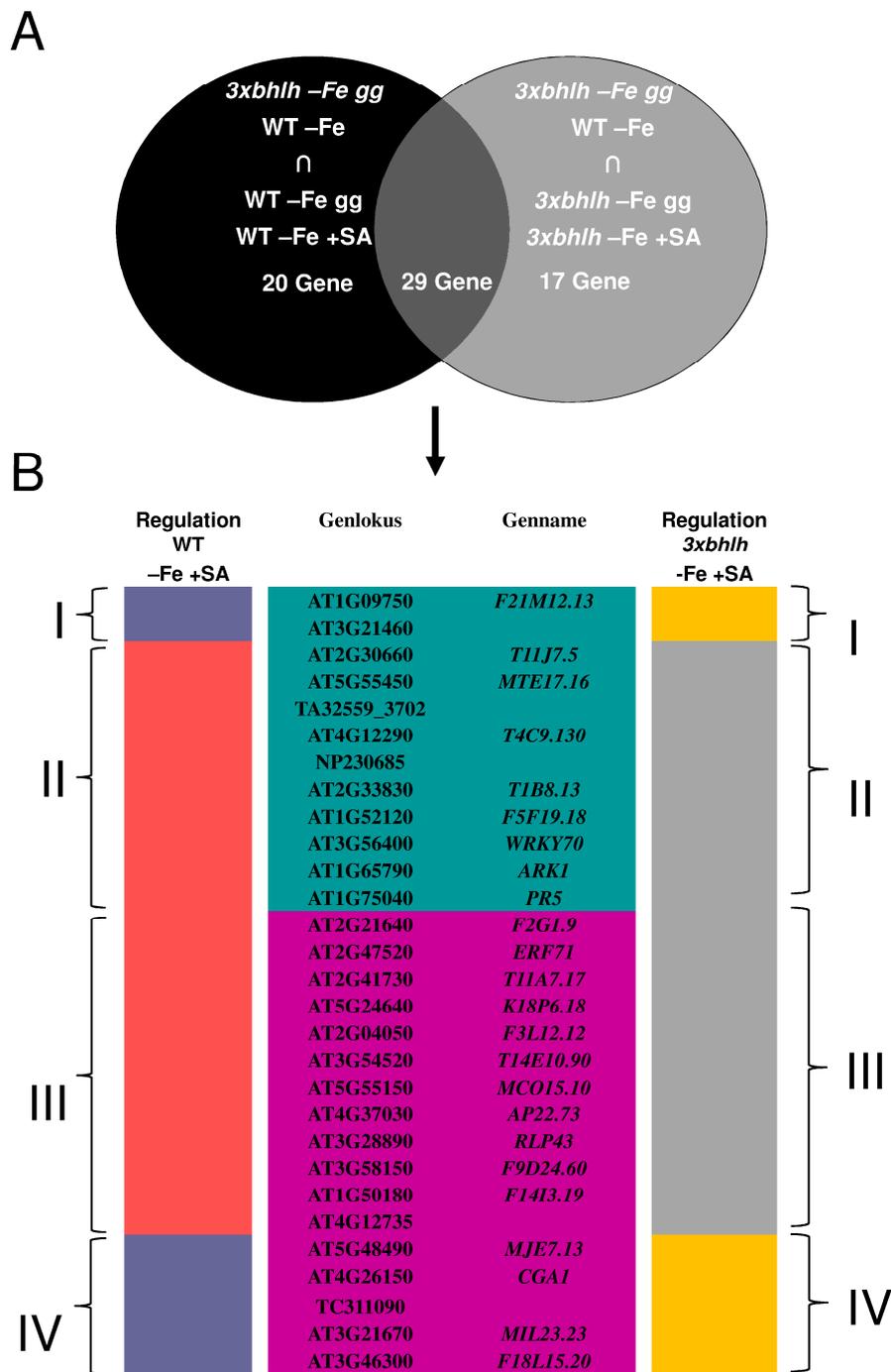


Abb. 20: Venn Diagramm zum Vergleich SA regulierter Gene in 3xbhlh und WT

Das Venn Diagramm zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede der differentiell regulierten Gene aus dem Vergleich *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap WT -Fe gegen WT -Fe +SA (siehe Abb. 18) mit dem Vergleich *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe \cap WT -Fe gegen WT -Fe +SA (siehe Abb. 19) (A). Die Tabelle zeigt die 29 Gene der Schnittmenge des Venn Diagramms aus A, die in der *3xbhlh* Mutante bei -Fe im Vergleich zum WT herunter reguliert oder hoch reguliert sind und deren Induktion bei -Fe im WT oder -Fe in der *3xbhlh* im Vergleich zu -Fe +SA Bedingungen. Im Vergleich zu -Fe Bedingungen wird die Induktion der Gene bei -Fe +SA im WT bzw. -Fe +SA in der *3xbhlh* Mutante angezeigt. Abhängig von ihrer Regulation sind die Gene wie in Abb. 18 und Abb. 19 in die Gruppen I bis IV eingeteilt. (B).

Ergebnisse

Um den Vergleich aus dieser Analyse zu komplettieren sollte in der folgenden Analyse untersucht werden welche und wieviele Gene in der Mutante bei -Fe und unter Einfluss von SA tatsächlich signifikant anders reguliert sind als im WT (Abb. 21). Dazu wurden 36 bei -Fe +SA in der *3xbhlh* Mutante differentiell zum WT regulierte Gene gefunden und mit den 121 Genen in einem Venn Diagramm verglichen, die in der *3xbhlh* Mutante bei -Fe dereguliert sind (siehe Anhang *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe). Die Schnittmenge enthält 20 gleichzeitig bei Eisenmangel und bei Eisenmangel unter Einfluss von SA in der *3xbhlh* Mutante differentiell exprimierte Gene (Abb. 21B). Die Differenzmenge der Gene, die nur bei Eisenmangel unter Einfluss von SA in der Mutante differentiell reguliert sind, enthält 16 Gene während die Differenzmenge von WT und *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel 101 Gene umfasst (Abb. 21A).

Vergleicht man nun die Anzahl der in der Mutante bei -Fe deregulierten Gene mit denen der -Fe +SA Bedingung, sind mit insgesamt 36 Genen wesentlich weniger Gene in der Mutante bei -Fe +SA unterschiedlich zum WT reguliert als bei Eisenmangel alleine (Abb. 22A, B). Betrachtet man nur diejenigen Gene die ausschließlich in einer der beiden Mengen nicht aber in der Schnittmenge vorkommen, beträgt der prozentuale Anteil deregulierter Gene, die nur durch -Fe reguliert werden 74% (Abb. 22B). Nur 12% der in der *3xbhlh* differentiell zum WT regulierten Gene dieses Vergleichs sind SA abhängig, während 14% durch beide Bedingungen reguliert werden (Abb. 22B).

Die 12 Gene der Schnittmenge, die bei Eisenmangel in der *3xbhlh* gegenüber dem WT herunter reguliert (graugrün markiert) sind, zeigen gleichzeitig alle eine signifikant stärkere Expression im WT bei -Fe +SA als in der Mutante bei -Fe +SA (rot markiert, Abb. 21B). Die Gruppe umfasst die Gene At3g21460, *CYP82C4*, At3g54730, *SADHU5-1*, At4g04601, At1g52120, *BHLH39*, At4g04223, At3g07720, At5g45500, *QQS* und *COBL6*. Darunter befinden sich die bereits in Abschnitt 6.1.7.1 als in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel differentiell reguliert charakterisierten Gene *COBL6* (*COBRA-LIKE PROTEIN 6 PRECURSOR*), *CYP82C4*, *BHLH39* und At3g07720. Das zeigt an, dass diese Gene in der *3xbhlh* Mutante sowohl bei -Fe als auch bei -Fe +SA Bedingungen unterschiedlich zum WT exprimiert werden. Die zuvor in Abschnitt 6.1.7.1 nicht in der Schnittmenge befindlichen Gene At3g21460, At3g54730, *SADHU5-1*, At4g04601, At1g52120, At4g04223 und At5g45500 sind möglicherweise im WT speziell eisenmangel- und salizylsäureinduzierte Gene, deren Regulation über die Ib (2) bHLHs abläuft, was in der *3xbhlh* Mutante zu einer veränderten Genexpression führt.

Ergebnisse

Allerdings sind die Funktionen dieser Gene bis auf das Glutathionredoxin At3g21460 (Rouhier, Couturier und Jacquot, 2006) bisher unbekannt.

Die 8 Gene der Schnittmenge, die bei -Fe in der *3xbhlh* gegenüber dem WT hochreguliert (pink markiert) sind, zeigen gleichzeitig alle eine signifikant stärkere Expression in der *3xbhlh* bei -Fe +SA als im WT (grau markiert, Abb. 21B). Die Gruppe umfasst die Gene AT3G56700, AT5G53230, AT3G28570, AT1G32900, AT2G41280, AT5G52940, AT2G03230 und AT2G41250. Darunter befindet sich das bereits in Abschnitt 6.1.7.1 als in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel differentiell reguliert charakterisierte Gen AT1G32900.

Die 16 Gene der Differenzmenge repräsentieren diejenigen in der Mutante differentiell exprimierten Gene, die hauptsächlich SA abhängig reguliert werden, da alle in WT und *3xbhlh* Mutante unterschiedlich eisenabhängig regulierten Gene von der Menge subtrahiert wurden. Folgende Gene sind in der Differenzmenge enthalten: AT1G68765, BT025685, AT5G07530, AT3G45060, AT1G48325, AT2G36885, AT5G45105, DR381543, AT5G38005, AT1G53635, AT2G20720, AT1G48930, AT1G54950, AT1G73603, AT4G39675 und AT1G21850.

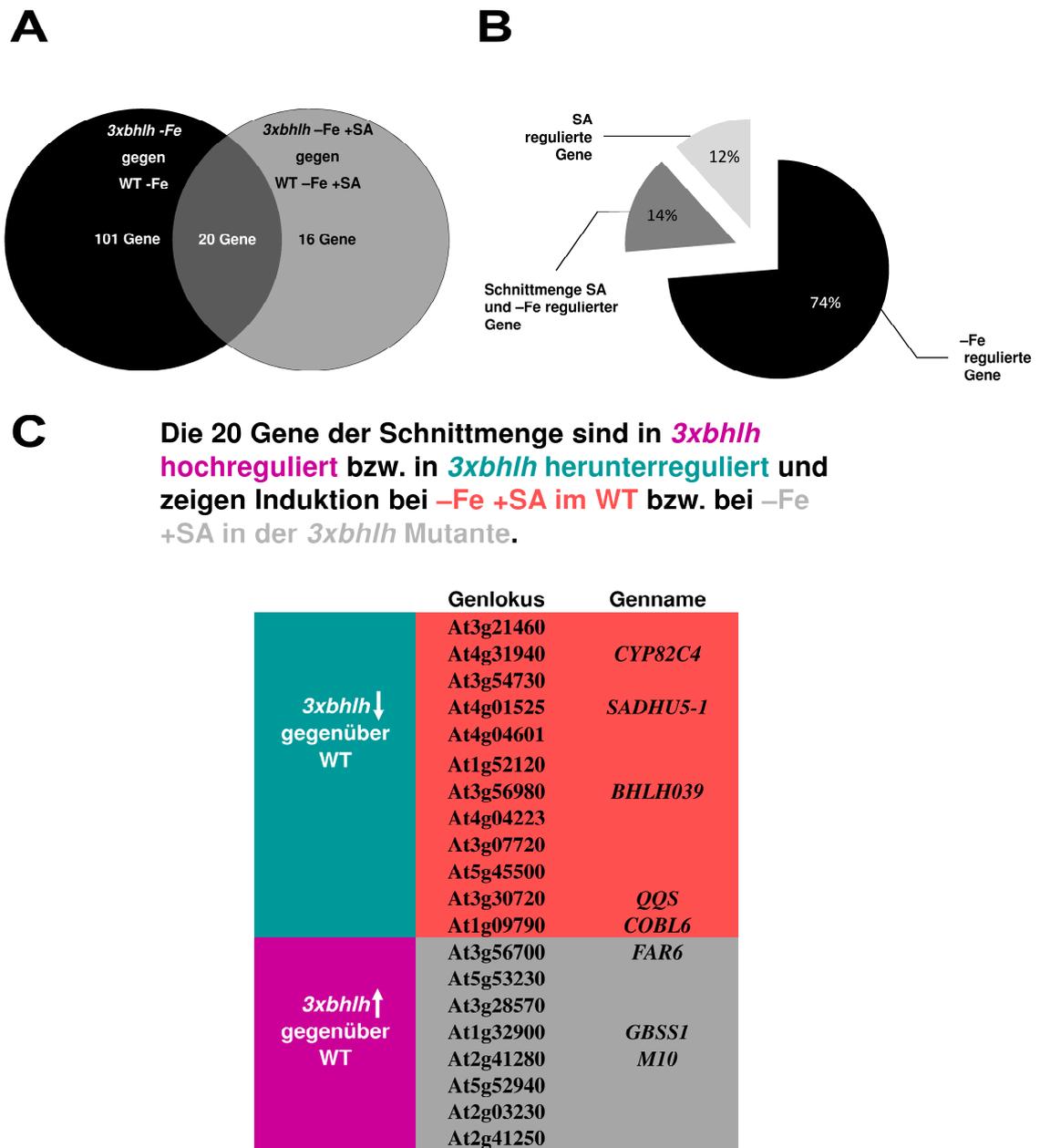


Abb. 21: Zweifach deregulierte Gene in der 3xbhlh bei -Fe und -Fe +SA im Vergleich zum WT

Das Venn Diagramm zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede der differentiell regulierten Gene in der *3xbhlh* bei Eisenmangel im Vergleich zum WT zu diejenigen Genen, die im WT bzw. der *3xbhlh* Mutante bei -Fe +SA im Vergleich zum jeweils anderen Genotyp stärker exprimiert sind (A). Verteilung der in der *3xbhlh* Mutante differentiell unterschiedlich zum WT regulierten Gene aus A (B). Die Tabelle zeigt die 20 Gene der Schnittmenge des Venn Diagramms, die bei -Fe in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum WT herunter reguliert oder hochreguliert sind und deren Induktion bei -Fe +SA im WT bzw. bei -Fe +SA in der *3xbhlh* Mutante im Vergleich zum jeweils anderen Genotyp (C).

6.2 Verifizierung und Charakterisierung einer 3xHA-BHLH39 Überexpressionslinie

6.2.1 Verifikation des 3xHA-BHLH39 Konstruktes auf Transkript- und Proteinebene in unabhängigen *Arabidopsis thaliana* Linien

Bei Eisenmangel bilden die Transkriptionsfaktoren bHLH38 bzw. bHLH39 mit FIT einem zentralen bHLH Transkriptionsfaktor der Eisenhomöostase (Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005; Bauer et al., 2007) Heterodimere in Arabidopsiswurzeln aus, die die Expression der Eisenaufnahmegene *FRO2* und *IRT1* induzieren (Yuan et al., 2008). Bei Untersuchungen mit *BHLH39* Überexpressionslinien in *Arabidopsis thaliana* wurden dann zwar keinerlei Phänotypen festgestellt, die *FRO2* und *IRT1* Expression war aber im Gegensatz zum WT auch bei +Fe induziert und der Eisengehalt der Überexpressionspflanzen auf Normalmedium war signifikant erhöht (Yuan et al., 2008; Jakoby et al., 2004; Meiser et al., 2011) Dagegen waren bei der Überexpression von *FIT* in Wurzeln keine phänotypischen Veränderungen oder Unterschiede in der Genexpression oder Aktivität von *FRO2* und *IRT1* beobachtet worden (Colangelo und Guerinot, 2004). Das zeigt, dass auch *BHLH39* einen starken Einfluss auf die Eisenaufnahme hat und daher die Erforschung des bHLH Transkriptionsfaktors zum Verständnis der Eisenmangelantwort bedeutend ist. Für die gesamte bHLH Untergruppe Ib(2) sind bisher keine Daten über die Regulation auf Proteinebene publiziert. Da für den Interaktionspartner *FIT* bisher angenommen wurde, dass er bei Eisenmangel nicht nur transkriptionell sondern auch posttranskriptionell reguliert wird (Jakoby et al., 2004) und kürzlich auch gezeigt werden konnte, dass *FIT* bei Eisenmangel destabilisiert und abgebaut wird (Lingam et al., 2011; Sivitz et al., 2011; Meiser et al., 2011), ist die Untersuchung der *bHLH39* Regulation auf Proteinebene der nächste Schritt zum Verständnis der Eisenmangelantwort. Um die Regulation des *bHLH39* Proteins im Zusammenhang der Eisenversorgung zu untersuchen, wurden daher 4 Überexpressionspflanzenlinien mit Hämagglutinin (HA) markiertem *bHLH39* unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* erstellt. In den transgenen Linien wird durch zwei CaMV 35S Promotoren eine konstitutive Transkription des *3xHA-bHLH39* erreicht, die sicherstellt, dass bei Unterschieden auf Proteinebene transkriptionelle Regulation ausgeschlossen werden kann. Alle 4 Pflanzenlinien sind Individuen und stammen aus unabhängigen

Ergebnisse

Elternlinien. Über die HA-Markierung kann das Fusionsprotein mittels monoklonalem Anti-HA-Antikörpern nachgewiesen werden. Zur ersten Kontrolle, ob das Fusionsprotein in den transgenen Pflanzen detektierbar ist und die erwartete Größe von 35,7 kDa besitzt wurden reinerbige Überexpressionspflanzen für 2 Wochen bei +Fe angezogen und anschließend für 3 Tage auf –Fe Hoaglandagarplatten überführt. Als Negativkontrolle dienten WT Pflanzen. Das Wurzelmaterial wurde geerntet und für den Western Blot in jeweils 2 technischen Replikaten verwendet (Abb. 22). Für alle getesteten Linien ist eine Proteinbande bei etwa 39 kDa sichtbar, die Negativkontrolle zeigt dagegen keine Bande und bestätigt damit die Spezifität des Anti-HA Antikörpers. Auch in weiteren Versuchen bestätigte sich, dass das 3xHA-bHLH39 Fusionsprotein immer bei etwa 39 kDa detektiert wurde und damit größer war als die erwarteten 35,7 kDa. In diesem Versuch variiert die Intensität der Banden innerhalb der 4 Linien stark. Klare Banden sind für Linie JM78-5 zu erkennen (Abb. 22). Das Ergebnis zeigt, dass die einzelnen Linien das transgene *3xHA-BHLH39* wahrscheinlich unterschiedlich stark exprimieren. Für spätere Experimente wurde aufgrund des starken Signals im Western Blot daher die Linie JM78-5 unter dem Namen 39ox weiterverwendet.

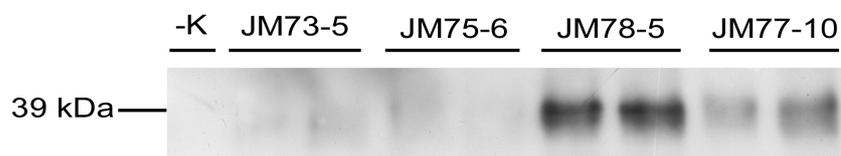


Abb. 22: Test auf Vorhandensein des 3xHA-bHLH39 Fusionsproteins in unabhängigen A.t. Linien
3xHA-bHLH39 und untransformierte Col-0 (-Kontrolle) Pflanzen wurden für 2 Wochen auf Hoaglandagarplatten mit 50 μ M FeNa-EDTA angezogen und anschließend für 3 Tage auf 0 μ M FeNa-EDTA Hoaglandagarplatten transferiert. Das Wurzelmaterial wurde geerntet und für den Western Blot in technischen Replikaten verwendet. Pro Probe wurden 10 μ g Gesamtprotein geladen. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HA Antikörper.

Um die *BHLH39* Überexpression auf Genexpressionsebene zu überprüfen und zu testen, ob die unterschiedlich starken Western Blot Signale mit der Genexpression übereinstimmen, wurden qRT-PCR Analysen mit Wurzeln und Blättern der 4 transgenen Linien durchgeführt. Dazu wurden Überexpressionspflanzen für 2 Wochen bei +Fe angezogen und anschließend für 3 Tage auf +Fe bzw. –Fe Hoaglandagarplatten überführt. Wurzeln (Abb. 23 A, B) und Blätter (Abb. 23 C, D) wurden für die qRT-PCR getrennt geerntet. Die Expressionsstudien für die Linien JM73-5, JM75-6 und

Ergebnisse

JM77-10 (Abb. 23 A, C) wurden in einem qRT-PCR Experiment durchgeführt, die Expressionsstudien für JM78-5 wurden aufgrund der Probenanzahl in einer separaten zweiten Analyse durchgeführt für die die cDNA ebenfalls separat hergestellt wurde (Abb. 23 B, D). In beiden Experimenten wurde jeweils eine eigene WT Kontrolle mitgeführt. Zur Vergleichbarkeit der Expressionswerte sind beide Analysen in einer Abbildung dargestellt (Abb. 23 A, B, C, D).

Bei +Fe und -Fe in beiden Geweben liegen die *BHLH39* Expressionswerte aller 4 Linien statistisch signifikant über dem WT Niveau und bestätigen damit die Überexpression (Abb. 23ABCD). Im WT ist in Wurzeln bei -Fe eine Induktion um das 4fache (Abb. 23A) und das 4,5fache (Abb. 23B) im Vergleich zur +Fe Bedingung zu erkennen, die Überexpressionslinien dagegen zeigen keine Induktion bei Eisenmangel, sondern eine gleichbleibend hohe *BHLH39* Expression bei +Fe und -Fe. Die Expressionswerte sind in Wurzeln bei +Fe für die Linie JM77-10 (Abb. 23A) etwa 60mal höher als im WT, für die Linie JM78-5 (Abb. 23B) etwa 80mal so hoch wie im WT. Unter Eisenmangel in Wurzeln erreicht die Linie JM77-10 (Abb. 23A) ähnliche Expressionswerte wie bei +Fe und hat damit eine etwa 11mal höhere Expression als der WT, die Linie JM78-5 (Abb. 23B) eine etwa 9mal so hohe wie der WT. Insgesamt zeigt der WT in Wurzeln eine Induktion von *BHLH39* bei Eisenmangel, die Überexpressionslinien dagegen exprimieren *BHLH39* konstitutiv, unabhängig von der Eisenversorgung. Die Linie JM78-5 erreicht zumindest bei +Fe Bedingungen die höchsten Expressionswerte, bei -Fe ist aufgrund der Fehlerbalken der Linie JM78-5 keine definitive Aussage möglich, die Werte sind allerdings allgemein etwas geringer als bei +Fe. Damit entsprechen die Expressionsdaten in Wurzeln nur annähernd den Ergebnissen des Western Blots, nach dem die stärksten Signale bei -Fe in Wurzeln von den Linien JM77-10 und JM78-5 ausgegangen waren. Aufgrund der Expressionsdaten wäre ein stärkeres Signal für JM73-5 zu erwarten gewesen.

Die Expressionsanalyse in Blättern (Abb. 23CD) zeigt im WT bei -Fe eine Induktion der Genexpression von *BHLH39* um das 66fache (Abb. 23C) und das 34fache (Abb. 23D) im Vergleich zur +Fe Bedingung, die Überexpressionslinien dagegen zeigen keine Induktion bei Eisenmangel, sondern wie bereits im Wurzelgewebe eine gleichbleibend hohe *BHLH39* Expression bei +Fe und -Fe. Die stärksten Expressionswerte erreichen hier die Linien JM77-10 und JM78-5, die bei +Fe das 1800fache (Abb. 23C) und das 3200fache (Abb. 23D) der WT Werte erreichen und bei -Fe das 25fache (Abb. 23C) und das 41fache (Abb. 23D) der WT Werte. In Blättern ist die *BHLH39* Expression der

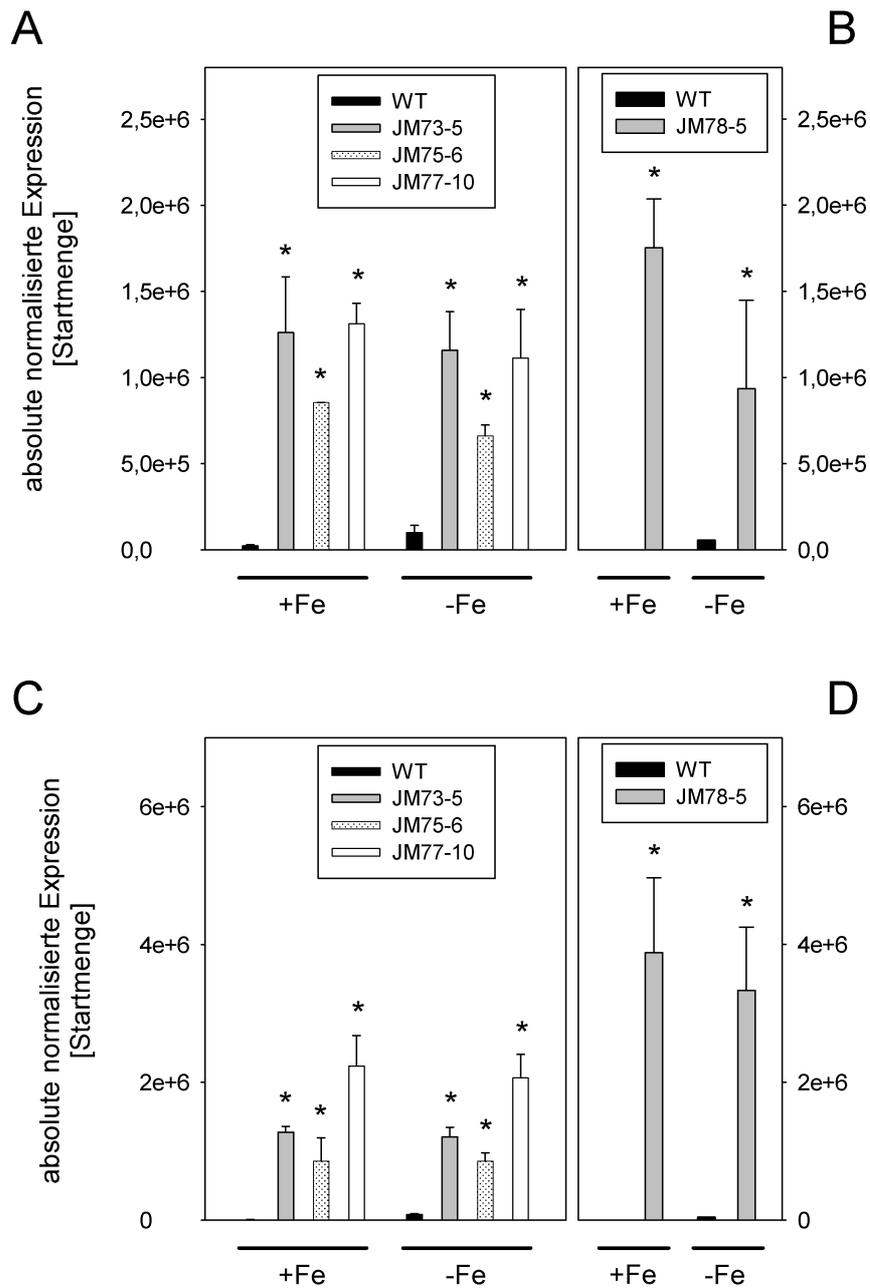


Abb. 23: *BHLH39* Expressionsanalysen in Wurzeln und Blättern unabhängiger *BHLH39* Überexpressionslinien

BHLH39 Überexpressionslinien und WT Pflanzen wurden für 14 Tage bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) angezogen und anschließend für 3 Tage auf 0 μ M FeNa-EDTA oder 50 μ M FeNa-EDTA Hoaglandagarplatten überführt. Die Expression von *BHLH39* in Wurzeln (A, B) und Blättern (C, D) wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die in A, C dargestellten Expressionswerte wurden in einem gemeinsamen Experiment untersucht sowie die in B, D gezeigten Ergebnisse ebenfalls ein gemeinsames unabhängiges Experiment bilden. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2 (A,C) n=3 (B,D). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT und Überexpressionslinie der gleichen Bedingungen sind mit einem * gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0,05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

Überexpressionslinien teilweise höher als im Wurzelgewebe, was den Beobachtungen im WT widerspricht. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Überexpression in allen 4 Linien bestätigt werden konnte. Die Überexpressionslinien zeigen in Wurzeln und Blättern eine konstitutive *BHLH39* Expression, die unabhängig von der Eisenversorgung ist.

6.2.1.1 Phänotypische Charakterisierung der *BHLH39*

Überexpressionslinie JM78-5

Beim Wachstum auf +Fe Hoaglandagarplatten zeigen alle 4 zuvor beschriebenen Überexpressionslinien einen gemeinsamen Phänotyp. Exemplarisch für alle Linien ist hier nur die Linie JM78-5 (39ox) im Habitus im Vergleich zum WT dargestellt (Abb. 24). Der Phänotyp stellt sich in zwergenhaftem Wuchs, verkürzten Wurzeln und verstärkter Seitenwurzelausbildung dar und erst etwa ab dem 8. Tag erkennbar. Nach 14 Tagen ist der Phänotyp voll ausgeprägt und die Wurzeln zeigen seit etwa 6 Tagen kaum einen Zuwachs (Abb. 24 rechts oben). Der zwergenhafte Wuchs kann allerdings durch umsetzen auf Erde wieder in eine WT gleiche Erscheinung umgekehrt werden, so dass nach 7 weiteren Tagen wieder ein WT ähnlicher Habitus erreicht wird (Abb. 24 rechts unten). Das Auftreten des Phänotyps in allen 4 individuellen Linien ist ein Hinweis darauf, dass der Phänotyp nicht durch einen zufälligen Positionseffekt der T-DNA Insertion auftritt, sondern tatsächlich auf die Aktivität des überexprimierten *BHLH39* Gens zurückzuführen ist.

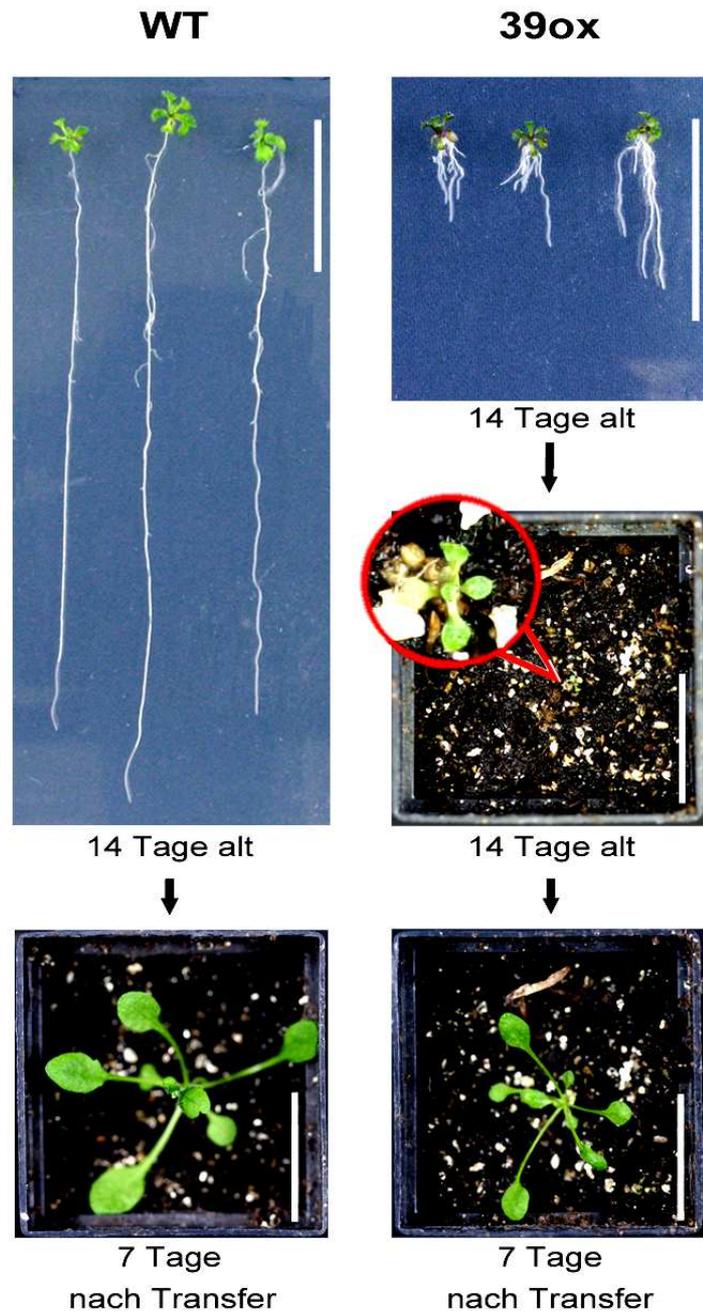


Abb. 24: Phänotyp der *BHLH39* Überexpressionslinie JM78-5 (39ox) im Vergleich zum WT
 WT und 39ox Pflanzen wurden für 14 Tage bei ausreichender Eisenversorgung ($50 \mu\text{M}$ FeNa-EDTA) auf Hoaglandagarplatten unter Langtagbedingungen angezogen und dann auf Erde transferiert. 39ox Pflanzen zeigen reduziertes Wachstum von Blättern und Wurzeln, der Phänotyp kann allerdings durch verpflanzen auf Erde als Substrat nach 7 bis 10 Tagen gerettet werden. Die weiße Linie am rechten unteren Rand jedes Fotos dient als Größenstandard und entspricht 2 cm.

Ergebnisse

Um die statistische Signifikanz phänotypischer Merkmale zu untersuchen, wurde eine Wurzellängenmessung in allen 4 Linien durchgeführt. Dazu wurden WT und *BHLH39* Überexpressionspflanzen für 14 Tage auf +Fe Hoaglandagarplatten angezogen und die Wurzeln dann per Hand vermessen (Abb. 25 A, B). Die Wurzellängenmessungen für die Linien JM73-5, JM75-6 und JM77-10 (Abb. 25 A) wurden in einem Experiment durchgeführt (n=15), die Messungen für JM78-5 wurden aufgrund der größeren Probenanzahl (n=50) in einer separaten zweiten Analyse durchgeführt (Abb. 25B). In beiden Experimenten wurde jeweils eine eigene WT Kontrolle mitgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Wurzellängen sind beide Messungen in einer Abbildung dargestellt (Abb. 25 A, B). Die schwarzen Balken repräsentieren jeweils den WT und zeigen in beiden Experimenten nach 14 Tagen eine Wurzellänge von etwa 7,5 bis 9 cm. Alle Überexpressionslinien haben statistisch signifikant kürzere Wurzeln als der jeweilige WT mit Längen zwischen 1 und 4 cm. Die Linien JM77-10 (Abb. 25 A) und JM78-5 (Abb. 25 B), die bereits in der Genexpressionsanalyse (Abb. 23 A, B) bei +Fe in Wurzeln eine sehr starke *BHLH39* Überexpression gezeigt haben, besitzen die am meisten verkürzten Wurzeln. Die statistische Signifikanz der morphologischen Veränderung in allen 4 unabhängigen Linien bestärkt die Hypothese, dass der Phänotyp nicht auf einen zufälligen Positionseffekt der T-DNA zurückgeht, sondern durch die Folgen der *BHLH39* Überexpression verursacht wird. Da *bHLH39* mit FIT interagiert um die Expression der Eisenaufnahmegene zu regulieren, wäre eine mögliche Folge der Überexpression eine veränderte Regulation der Zielgene *FRO2* und *IRT1* und damit eine modifizierte Eisenaufnahme. Diese veränderte Eisenaufnahme könnte zu einem solchen Phänotyp führen.

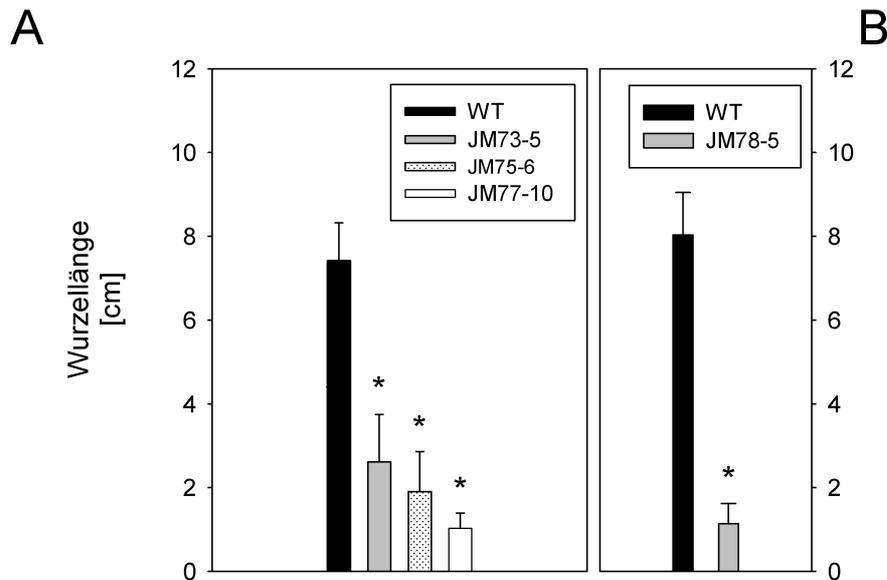


Abb. 25: Wurzellängenmessung in unabhängigen *BHLH39* Überexpressionslinien

BHLH39 Überexpressionslinien und WT Pflanzen wurden für 14 Tage bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) auf Hoaglandagarplatten angezogen. Die Wurzellänge für die Linien JM73-5, JM75-6, JM77-10 und den WT (A) sowie die Wurzellängen für die Linie JM78-5 und den WT (B) wurden in zwei getrennten Experimenten ermittelt. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, für A ist n=15, für B ist n=50. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT und Überexpressionslinie sind mit einem * gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

6.2.1.2 Genexpressionsanalyse der Eisenhomöostasegene in *BHLH39* Überexpressionspflanzen der Linie JM78-5

Genexpressionsstudien sollen zeigen ob die *BHLH39* Überexpression in der Linie JM78-5 (39ox) zu einer veränderte Regulation von Eisenhomöostasegenen geführt hat. Besonders interessant ist die Untersuchung des zentralen Regulators FIT, dessen Interaktionspartner bHLH38/39, ihrer nächsten Homologe bHLH100/101, sowie der Zielgene *FRO2* und *IRT1*, deren Deregulation möglicherweise auch den Phänotyp erklären könnte. Zu diesem Zweck wurden *BHLH39* Überexpressionslinien und WT Pflanzen für 14 Tage bei +Fe angezogen und anschließend für 3 Tage auf -Fe oder +Fe Hoaglandagarplatten überführt. Die Expression von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* wurde im Wurzelgewebe mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht (Abb. 26). Im WT zeigt *FIT* eine Induktion als Antwort auf den Eisenmangel, während in den 39ox Pflanzen die Expressionswerte für *FIT* in beiden Bedingungen etwa dem WT Wert bei -Fe entspricht. *FRO2* und *IRT1* sind im WT bei -Fe ebenfalls induziert, in der Überexpressionslinie liegen die Expressionszahlen in beiden Bedingungen jedoch

über den korrespondierenden des WT, eine Induktion ist hier für beide Gene allerdings nicht erkennbar, da die Werte der -Fe Bedingung unter Berücksichtigung der Fehlerbalken den +Fe Bedingungen ähnlich sind. Diese Expressionslevel in den 39ox Pflanzen entsprechen für *FIT* und *FRO2* etwa dem des WT bei Eisenmangel, die *IRT1* Expression erreicht allerdings das 26fache des WT bei +Fe und das 3fache des WT bei -Fe (Abb. 26).

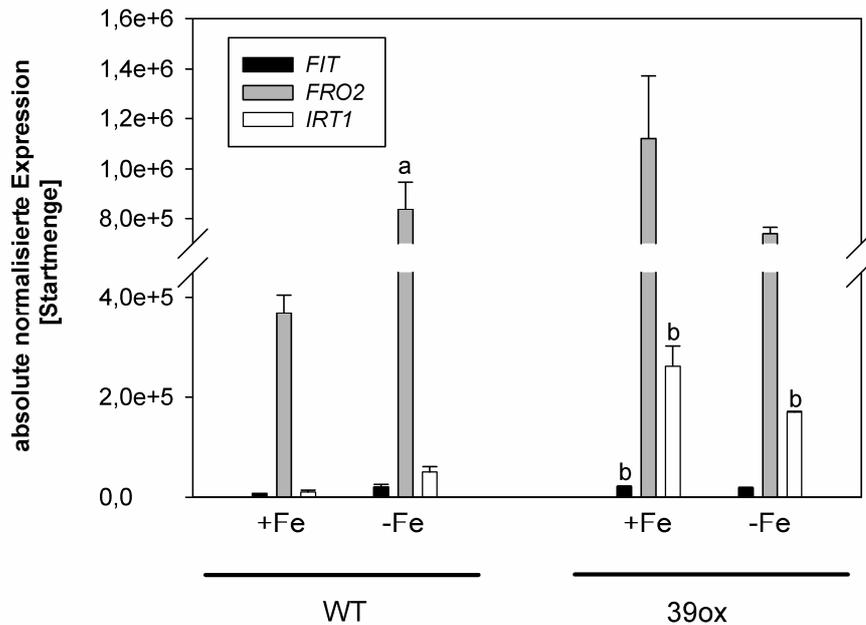


Abb. 26: Expressionsanalyse der Eisenhomöostasegene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* in Wurzeln der *BHLH39* Überexpressionslinie JM78-5 im Vergleich zum WT

BHLH39 Überexpressionslinien und WT Pflanzen wurden für 14 Tage bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) angezogen und anschließend für 3 Tage auf 0 μ M FeNa-EDTA oder 50 μ M FeNa-EDTA Hoaglandagarplatten überführt. Die Expression von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Bedingungen eines Genotyps sind mit „a“ gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen WT und Überexpressionslinie der gleichen Bedingungen sind mit einem "b" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

Die Genexpressionsanalyse zeigt, dass durch die Überexpression von *BHLH39* in der Linie JM78-5 die Expression des Transkriptionsfaktors *FIT* und des Zielgens *FRO2* unabhängig von der Eisenversorgung auf ein Niveau angehoben wird, das im WT nur bei Eisenmangel herrscht. Die Expressionswerte des Eisentransporters *IRT1* sind als Folge

Ergebnisse

der Überexpression unabhängig vom Eisenstatus sogar auf ein mehrfaches der WT Werte erhöht. Damit wird die Annahme bestätigt, dass die *BHLH39* Überexpression zu einer veränderten Genexpression der Eisenmangelantwortgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* geführt hat, die möglicherweise auch den Phänotyp erklärt.

In derselben Genexpressionsstudie wurde außerdem überprüft ob die *BHLH39* Überexpression, aufgrund teilweise redundanter Funktionen innerhalb der Ib(2) bHLH Gruppe (Wang et al., 2007), Effekte auf die Expression der anderen Gene dieser Gruppe in Wurzeln (Abb. 27A) und Blättern (Abb. 27B) hat. In beiden Geweben sind bei +Fe Bedingungen die Ib(2) bHLH Transkriptionsfaktoren in WT und 39ox Pflanzen schwach exprimiert, bis auf *BHLH39* in der Überexpressionslinie, dass wie schon zuvor gezeigt (Abb. 23BD) in Wurzeln und Blättern stark überexprimiert ist. In Wurzeln und Blättern des WT sind bei Eisenmangel alle 4 bHLH Transkriptionsfaktoren wie erwartet induziert (Wang et al., 2007), wobei die Induktion in Wurzeln nur für *BHLH38* und *BHLH101* und in Blättern nur für *BHLH38/39* und *BHLH100* statistisch signifikant ist (Abb. 27A). Vergleicht man WT und Überexpressionslinie bei Eisenmangel in beiden Geweben, zeigt sich, dass in der 39ox Linie interessanterweise keine Induktion für *BHLH38/100/101* stattgefunden hat (Abb. 27AB) und die Werte dadurch der +Fe Bedingung sehr ähnlich sind. Das heißt die konstitutive *BHLH39* Expression führt dazu, dass die restlichen 3 Mitglieder der bHLH Ib(2) Untergruppe bei Eisenmangel in Wurzeln und Blättern nicht mehr induziert werden. Möglicherweise sind die Funktionen innerhalb dieser Gruppe derartig redundant, dass die permanente Expression des *BHLH39* zur Aufrechterhaltung aller Funktionen in der Pflanze ausreicht und die anderen Mitglieder der Gruppe nicht mehr exprimiert werden. Vielleicht ist diese Beobachtung auch darauf zurückzuführen, dass die 39ox Pflanzen durch eine verstärkte Eisenaufnahme bei +Fe Bedingungen bei der anschließenden Anzucht auf -Fe Medium für 3 Tage nicht unter Eisenmangel leiden.

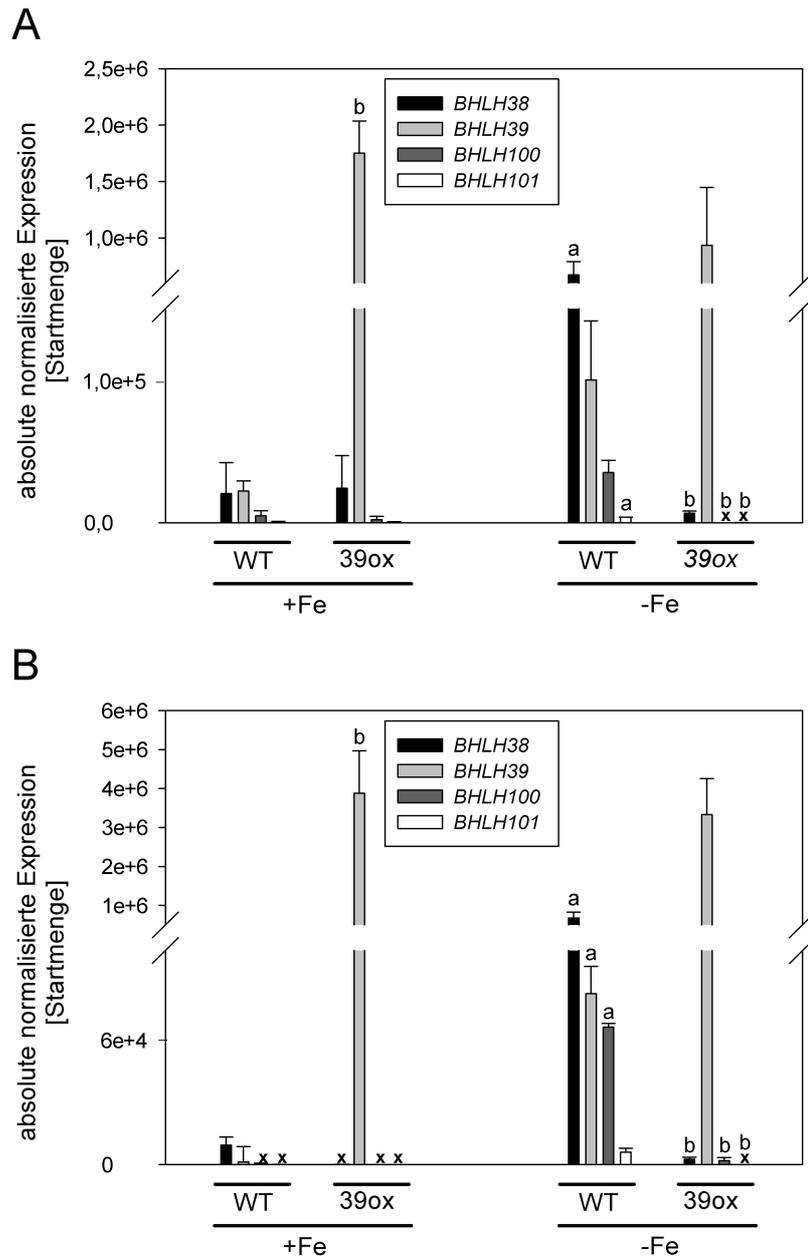


Abb. 27: Expressionsanalyse der Untergruppe Ib bHLH Transkriptionsfaktorgene in der *BHLH39* Überexpressionslinie JM78-5 (39ox)

JM78-5 und WT Pflanzen wurden für 14 Tage bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) auf Hoaglandagarplatten angezogen und anschließend für 3d auf Eisenmangelagarplatten (0 μ M FeNa-EDTA) oder Agarplatten mit ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) überführt. Die Expression von *BHLH38*, *39*, *100* und *101* wurde in Wurzeln (A) und Blättern (B) mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen +Fe und -Fe Bedingung eines Genotyps sind mit einem "a" markiert, signifikante Unterschiede zwischen WT und Überexpressionslinie der gleichen Bedingungen sind mit einem "b" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

6.2.1.3 Metallgehaltsbestimmung in der *BHLH39* Überexpressionslinie JM78-5

Um zu überprüfen, ob die veränderte *IRT1* Expression (Abb. 26) durch Überexpression von *BHLH39* auch zu einer erhöhten Eisenaufnahme aus dem Substrat führt, die ein Grund für physiologischen Veränderungen (Abb. 24 und Abb. 25) sein könnte, wurden 39ox Pflanzen für 2 Wochen auf +Fe Hoaglandagarplatten angezogen und dann für 3 Tage bei +Fe bzw. -Fe weiter kultiviert. Dann wurden die Blätter zur Eisengehaltsmessung verwendet (Abb. 28). Der WT hat bei +Fe einen Eisengehalt von 138 $\mu\text{g/g}$ Trockengewicht, dieser Wert ist in der Eisenmangelbedingung mit einem Wert von 83 $\mu\text{g/gTG}$ um 30% reduziert. Die *BHLH39ox* Pflanzen sind unter beiden Bedingungen signifikant eisenhaltiger, sie enthalten im Vergleich zum WT bei +Fe die vierfache und bei -Fe die dreifache Menge an Eisen (Abb. 28).

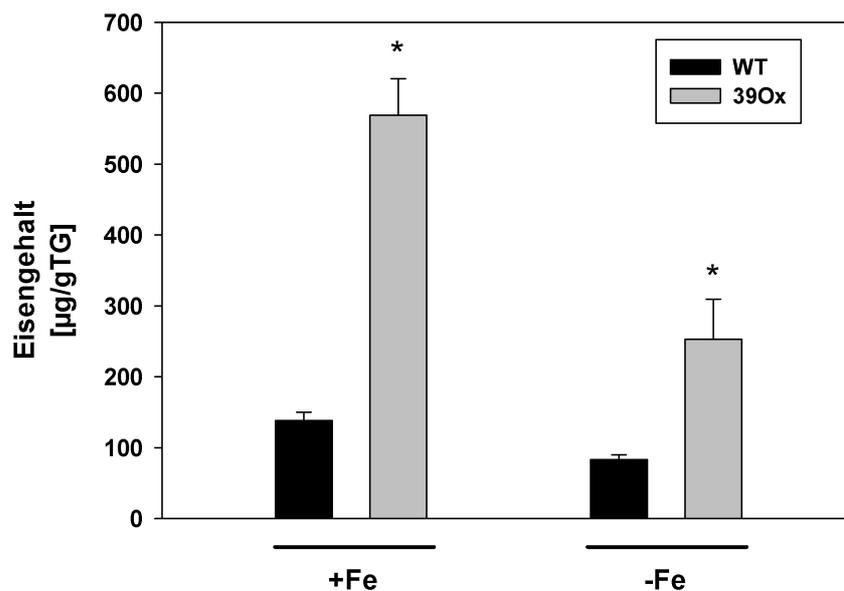


Abb. 28: Eisengehalt in Blättern von WT und *BHLH39* Überexpressionspflanzen der Linie JM78-5

Die Pflanzen wurden für 2 Wochen auf Hoaglandagarplatten mit ausreichender Eisenversorgung (50 μM Fe) angezogen und dann für 3 Tage bei genügender Eisenversorgung (50 μM FeNa-EDTA) oder Eisenmangel (0 μM FeNa-EDTA) weiter kultiviert. Nach der Ernte der Blätter wurden das Pflanzenmaterial getrocknet, gemörsert und zur ICP-AAS Messung verwendet. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, $n=4$. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT und Überexpressionslinie bei gleicher Bedingung sind mit einem * gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

Die Überexpression von *BHLH39* führt zumindest bei ausreichender Eisenversorgung zu einer verstärkten Eisenaufnahme aus dem Substrat und bestätigt damit zum Teil zuvor publizierte Ergebnisse mit *BHLH39* Überexpressionslinien (Yuan et al., 2008). Die signifikant höheren Werte bei -Fe könnten möglicherweise durch bereits im Samen gespeicherte Eisenvorräte erklärt werden. Die erstmals beobachteten physiologischen Veränderungen (Abb. 24 und Abb. 25), in den Überexpressionslinien, werden sehr wahrscheinlich von den, weit über WT Niveau liegenden, Eisenkonzentrationen hervorgerufen. Das Ergebnis deutet an, dass eine höhere Aktivität oder Proteinmenge des Eisentransporters *IRT1* vorliegt, der als Zielgen des FIT/bHLH38 bzw. bHLH39 Heterodimers gilt (Yuan et al., 2008). Hervorgerufen wird dieser Effekt durch die konstitutive Expression von *BHLH39*. Das Ergebnis wird zudem auch durch die gezeigten hohen Expressionswerte von *IRT1* in der Überexpressionslinie (Abb. 26) bestätigt.

6.2.1.4 Kolorimetrischer Eisenreduktaseassay

Das zweite Ziel des FIT/bHLH38 bzw. bHLH39 Komplexes außer *IRT1* ist das Eisenchelatreduktasegen *FRO2* (Yuan et al., 2008). Um zu überprüfen, ob die veränderte *FRO2* Expression (Abb. 26) durch Überexpression von *BHLH39* auch zu verstärkten Reduktionsreaktionen an der Wurzel führt, die die gezeigte hohe Eisenaufnahme (Abb. 28) begünstigen würde (Connolly et al., 2003; Robinson et al., 1999), wurde ein kolorimetrischer Eisenreduktaseassay durchgeführt (Abb. 29). Dazu wurden WT, *fit*, FITox und 39ox Pflanzen für 6 Tage auf +Fe bzw. -Fe Hoaglandagar angezogen und dann für 0,5 Stunden im Dunkeln auf dem Testmedium inkubiert. Eine Rosafärbung des Mediums zeigt anschließend die Reduktaseaktivität an. Im WT zeigt der Reduktaseassay eine Rosafärbung des Mediums etwa im Bereich der Wurzelhaarzone nur bei -Fe, während in der *fit* Mutante keinerlei Reduktaseaktivität erkennbar ist (Abb. 29). In der *FIT* Überexpressionslinie (FITox) ist die Reduktaseaktivität wie im WT nur bei -Fe zu beobachten und befindet sich dabei auf WT Niveau. Die 39ox Pflanzen zeigen bei +Fe Bedingungen Reduktaseaktivität etwa im Bereich der Wurzelhaarzone, bei Eisenmangel erstreckt sich die Reduktaseaktivität über die gesamte Wurzellänge. Das zeigt, dass die *BHLH39* Überexpression zur Reduktaseaktivität bei Eisenmangel und auch bei ausreichender Eisenversorgung führt, welche die beobachtete hohe Eisenaufnahme begünstigt hat (Abb. 28) und stimmt auch mit dem beobachteten Expressionstatus (Abb. 26) überein. Allerdings waren die Expressionswerte für *FRO2* bei beiden

Ergebnisse

Eisenbedingungen ähnlich (Abb. 26), der Reduktaseassay zeigt aber zusätzlich, dass die lokale Begrenzung der Reduktaseaktivität auf die Wurzelspitze nur bei +Fe auftritt, bei – Fe allerdings an der gesamten Wurzel Reduktionen stattfinden. Interessant ist dass dieser Effekt in den FITox Pflanzen nicht auftritt, obwohl FIT mit bHLH38/39 zur *FRO2* Regulation dimerisiert und laut Yuan et al., 2008 als einziges dieser drei Proteine die Fähigkeit zur Homodimerbildung besitzt.

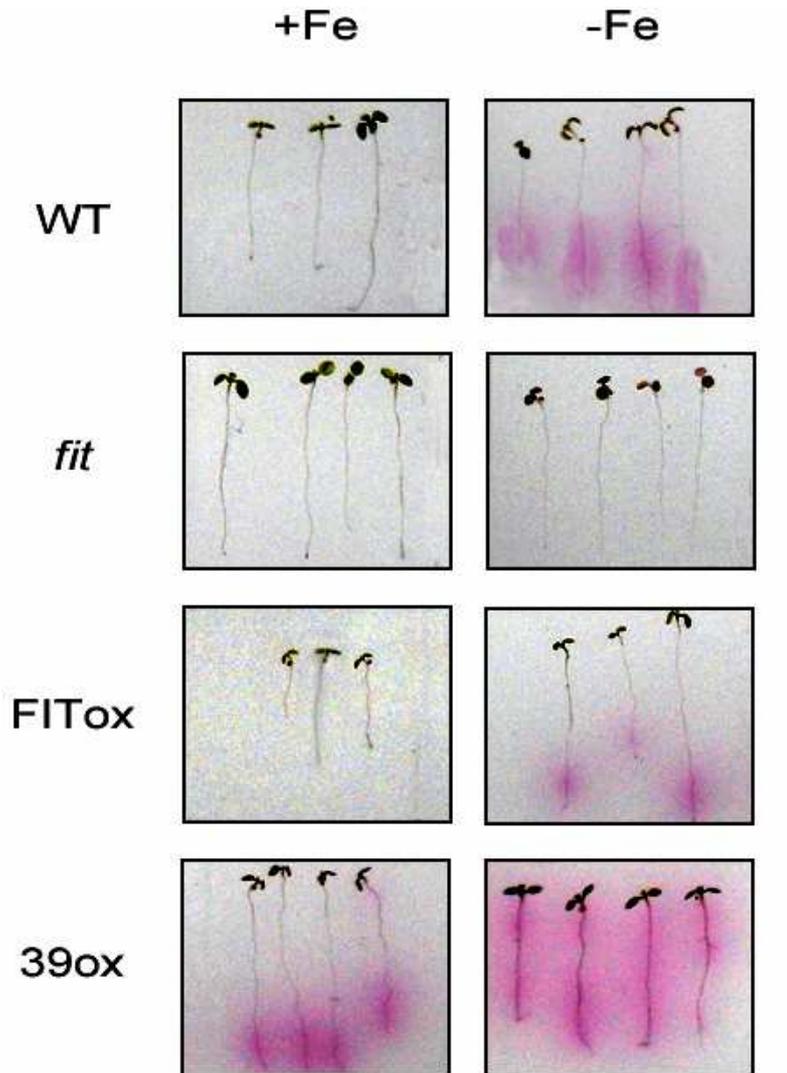


Abb. 29: Visualisierung der Eisen(III)chelate-Reduktaseaktivität der *BHLH39* Überexpressionslinie JM78-5 (39ox) im Vergleich zum WT, der *fit* Mutante und einer FIT Überexpressionslinie bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung

WT, *fit*, FITox und 39ox Pflanzen wurden für 6 Tage auf Hoaglandagar mit ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA), bzw. Eisenmangel angezogen (0 μ M FeNa-EDTA), dann für 0,5 Stunden auf das Testmedium (siehe Material und Methoden) übertragen und im Dunkeln inkubiert. Der Größenstandard entspricht 2,5 cm.

6.2.2 Regulation des bHLH39 Proteinlevels bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung

Die Regulation des bHLH39 Proteins bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung ist bisher nicht untersucht. Aus Expressionsstudien ist bekannt, dass Transkripte bei +Fe nur in geringer Zahl existieren, bei Eisenmangel die Genexpression aber induziert wird (Vorwieger et al., 2007, Wang et al., 2007). Um die Regulation des bHLH39 Proteins abhängig von der Eisenversorgung zu untersuchen und zu testen ob bHLH39 ähnlich wie sein Interaktionspartner FIT bei Eisenmangel ständiger Neusynthese und Abbau unterliegt (Meiser et al., 2011; Sivitz et al., 2011), wurde der Effekt von Cycloheximid auf das 3xHA-bHLH39 Protein untersucht (Abb. 30). Für dieses Experiment wurden Überexpressionspflanzen des Fusionsproteins HA-bHLH39 für 6 Tage bei ausreichender Eisenversorgung oder bei Eisenmangel auf Hoaglandagarplatten angezogen, anschließend für eine Stunde mit Cycloheximid behandelt, das die Translation inhibiert und dann direkt bzw. nach 4 Stunden als ganzer Keimling geerntet. Die Kontrolle wurde zum Vergleich nicht mit Cycloheximid behandelt und direkt geerntet. Aufgrund des Phänotyps der 39ox Pflanzen und der erhöhten Eisenaufnahme wäre bei ausreichender Eisenversorgung in dieser Untersuchung zu erwarten, dass das 3xHA-bHLH39 Protein ständig vorhanden ist und nicht abgebaut wird. Das Western Blot Experiment zeigt, dass das bHLH39 Protein in der Kontrolle sowohl bei +Fe als auch bei –Fe in etwa gleicher Menge vorhanden ist (Abb. 30). Bei der Behandlung mit Cycloheximid ist bei beiden Zeitpunkten klar erkennbar, dass die Proteinmenge bei +Fe etwa der der Kontrolle entspricht, bei –Fe allerdings wesentlich weniger Protein vorhanden ist als in der unbehandelten Kontrolle. In der 4 Stunden Probe ist im Vergleich zum Zeitpunkt 0 die Proteinmenge bei –Fe noch reduziert, auch wenn man in Betracht zieht, dass die Ponceau-S Färbung für die 4 Stunden –Fe Probe etwas weniger Protein anzeigt (Abb. 30). Das könnte entweder damit zusammenhängen, dass das Cycloheximid in der Pflanze noch wirksam ist oder die Neusynthese des Proteins länger andauert. Zusammen betrachtet ist das bHLH39 Protein durch die konstitutive Expression bei +Fe und –Fe vorhanden, unterliegt allerdings bei –Fe dem Proteinabbau. Interessanterweise zeigten sich die hier sichtbaren Mehrfachbanden auch in allen weiteren Versuchen mit langer Auftrennungszeit (Daten nicht gezeigt) des SDS Gels und deren Abwesenheit in WT Proben legen nahe, dass es sich um 3xHA-bHLH39 handelt. Die Mehrfachbanden könnten auf modifizierte

bHLH39 Proteine hinweisen. Die Ergebnisse des Cycloheximidexperiments wurden in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt und lassen den Schluss zu, dass bHLH39 bei $-Fe$ abgebaut wird und der Proteinlevel bei Eisenmangel nur durch konstante Neusynthese des Proteins erreicht wird.

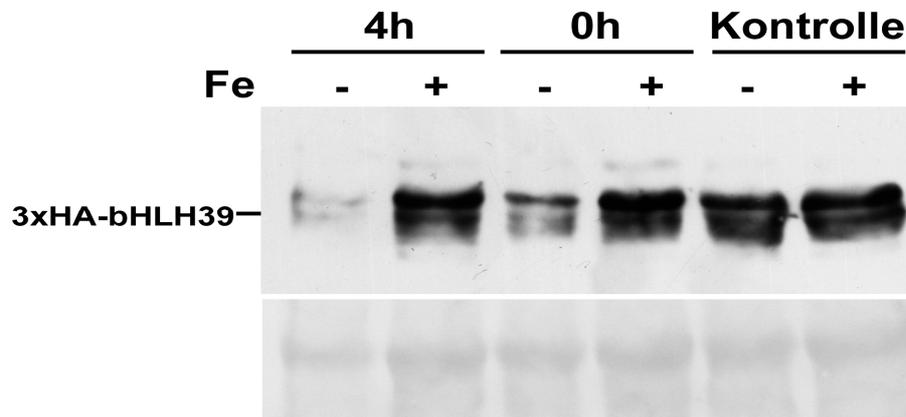


Abb. 30: Western Blot Analyse zur Wirkungsweise von Cycloheximid auf das HA-bHLH39 Fusionsprotein bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung

Überexpressionspflanzen des Fusionsproteins HA-bHLH39 (Linie JM78-5) wurden für 6 Tage bei ausreichender Eisenversorgung ($50 \mu\text{M}$ FeNa-EDTA, bezeichnet als “+Fe”) oder bei Eisenmangel ($0 \mu\text{M}$ FeNa-EDTA, bezeichnet als “-Fe”) auf Hoaglandagarplatten angezogen, anschließend für eine Stunde mit Cycloheximid behandelt und dann direkt bzw. nach 4 Stunden als ganzer Keimling geerntet. Die Kontrolle wurde zum Vergleich nicht mit Cycloheximid behandelt und direkt geerntet. Die Proteindetektion im Western Blot erfolgte mittels monoklonalem anti-HA Antikörper. Die Markierung für das HA-Fusionsprotein zeigt die erwartete Proteingröße an. Eine Ponceau-S Färbung dient als Ladekontrolle (unterer Teil der Abbildung).

6.2.3 Charakterisierung der *BHLH39* Überexpressionslinie auf Proteinebene bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung im Kontext hormonaler Netzwerke

Pflanzenhormone können die Eisenmangelantwort beeinflussen, so wirkt z.B. Auxin (Schikora und Schmidt, 2001; Chen et al., 2010) als positiver Regulator während Jasmonat die Expression der Eisenmangelgene negativ beeinflusst (Maurer et al., 2011). Speziell das Pflanzenhormon Ethylen spielt bei der Modulation der Eisenmangelantwort eine Rolle, es wird bei Eisenmangel gebildet (Romera et al., 1999) und dient als positiver Regulator der Eisenmangelantwort. Behandlung mit Ethylenvorläufern wie 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) verstärken die Eisenmangelantwort und damit

Ergebnisse

die *IRT1* und *FRO2* Genexpression (Lucena et al., 2006; Waters und Grusak, 2007; García et al., 2010). Für FIT, eine Komponente desjenigen Heterodimerkomplexes zusammen mit bHLH38 bzw. bHLH39, der die Expression der Eisenhomöostasegene *FRO2* und *IRT1* in Wurzeln induzieren kann (Yuan et al., 2008), konnte gezeigt werden, dass es auf Proteinebene ethylenabhängig reguliert werden kann (Lingam et al., 2011). In der kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte der Ethylensyntheseinhibitor AVG die FIT Proteinakkumulation unabhängig von transkriptioneller Regulation inhibieren (Lingam et al., 2011). Das heißt Ethylen kann die Eisenmangelantwort über die FIT Proteinstabilität beeinflussen, möglicherweise über EIN3/EIL1, den ethylenabhängigen Interaktionspartner von FIT (Lingam et al., 2011). Daher wäre es denkbar, dass auch bHLH38/39 auf Proteinebene durch Ethylen beeinflusst werden, um die Eisenmangelantwort aufs Feinstmögliche zu regulieren. Um zu überprüfen ob dies auch für das HA-bHLH39 Fusionsprotein zutrifft, wurden 39ox Pflanzen für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei ausreichender Eisenversorgung oder bei Eisenmangel jeweils entweder mit Zusatz des Ethylenvorläufers ACC (10 μ M) oder dem Zusatz des Ethylensyntheseinhibitors AVG (10 μ M) angezogen und als ganzer Keimling zum Western Blot verwendet. Durch Zugabe des Ethylenvorläufers sollte eine verstärkte Ethylenbildung in der Pflanze hervorgerufen werden bzw. durch den Inhibitor unterbunden werden um zu überprüfen ob die 3xHA-bHLH39 Proteinstabilität ähnlich wie FIT über Ethylen beeinflusst werden kann. Die Kontrolle wurde zum Vergleich ohne Zusätze auf +Fe bzw. -Fe Hoaglandagarplatten kultiviert. Wie bereits beschrieben (Abb. 30) sind auch in diesem Versuch in jeder Probe Mehrfachbanden zu beobachten und die Proteingröße ist höher als erwartet. In der Kontrolle sind die detektierten Proteinbanden, unter Berücksichtigung der schwächeren Ponceau-S Färbung für die -Fe Probe, sehr wahrscheinlich für beide Bedingungen gleich stark. Das entspricht auch den bereits gezeigten Ergebnissen (Abb. 30). Bei Zusatz des Ethylenvorläufers ACC scheinen ebenfalls beide Bedingungen die gleiche Bandenstärke zu besitzen, wenn man die geringere Proteinmenge in der +Fe Probe mit in Betracht zieht. Im Vergleich mit der Kontrolle lassen sich für beide Eisenbedingungen keine auffälligen Effekte des ACC auf den Proteinlevel des bHLH39 beobachten. Unter Einfluss des Ethylensyntheseinhibitors AVG scheinen beide Bedingungen die gleiche Bandenstärke zu besitzen, wenn man die geringere Proteinmenge in der +Fe Probe mit in Betracht zieht. Im Vergleich zur Kontrolle sind sowohl bei +Fe als auch bei -Fe keine starken Effekte des AVG auf den Proteinlevel des bHLH39 sichtbar. Es ist daher wahrscheinlich, dass in dieser

Ergebnisse

Versuchsanordnung Ethylen bHLH39 nicht auf Proteinlevel reguliert, da weder durch Induktion ethylenabhängiger Antworten über Zugabe von ACC eine Regulation zu beobachten ist, noch durch Inhibition der Ethylensynthese. Dieses Ergebnis wurde in 2 unabhängigen Experimenten bestätigt.

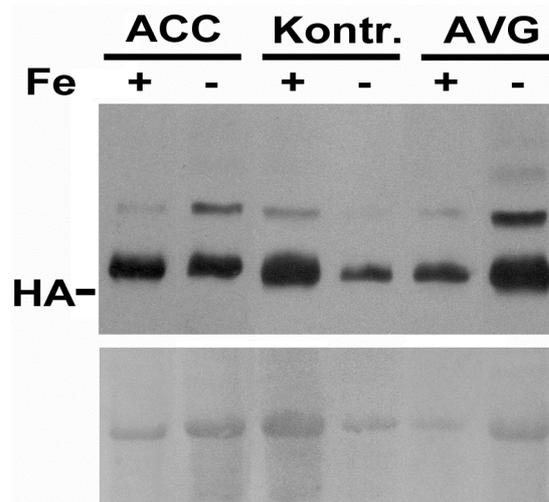


Abb. 31: Western Blot Analyse der Effekte des Ethylenvorläufers ACC und des Ethylenbiosyntheseinhibitors AVG auf das HA-bHLH39 Fusionsprotein bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung

Überexpressionspflanzen des Fusionsproteins HA-bHLH39 (Linie JM78-5) wurden für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA, bezeichnet als "+Fe") oder bei Eisenmangel (0 μ M FeNa-EDTA, bezeichnet als "-Fe") jeweils entweder mit Zusatz von 10 μ M ACC oder dem Zusatz von 10 μ M AVG angezogen und als ganzer Keimling zum Western Blot verwendet. Die Kontrolle wurde zum Vergleich ohne Zusätze auf +Fe bzw. -Fe Hoaglandagarplatten kultiviert. Die Proteindetektion im Western Blot erfolgte mittels monoklonalem anti-HA Antikörper. Die Markierung für das HA-Fusionsprotein zeigt die erwartete Proteingröße an. Eine Ponceau-S Färbung dient als Ladekontrolle (unterer Teil der Abbildung)

Ein weiteres Hormon das die Eisenmangelantwort über die Regulation der *BHLH38/39* Expression beeinflussen könnte ist die Salizylsäure. *BHLH38/39* werden nämlich als Ziel des salizylsäureinduzierbaren Dof (DNA binding with one finger) Transkriptionsfaktors *OBP3* (OBF-BINDIN PROTEIN 3) angesehen (Kang et al., 2003). Eine Koexpression von *OBP3* und *BHLH38/39* konnte in *OBP3*-Überexpressionslinien mit konstitutivem und auch mit induzierbarem Promotor gezeigt werden. Außerdem sind die Expressionslevel von *BHLH38/39* in *obp3* Mutanten reduziert (Kang et al., 2003), was darauf hindeutete, dass *OBP3* als positiver Regulator für *BHLH38/39* fungiert. Da die *OBP3* Expression durch Salizylsäure induziert werden kann, wurde die SA-

Ergebnisse

Induzierbarkeit von *BHLH38*, *BHLH39* und *OBP3* Transkripten in Arabidopsis Wurzeln getestet und bestätigt (Kang et al., 2003; Kang and Singh, 2000). Zur Erforschung weiterer Signale, die die Eisenmangelantwort modulieren, wurde daher der Einfluss der Salizylsäure bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung auf die Regulation des bHLH39 Proteins untersucht. Dazu wurden 39ox Pflanzen für 14 Tage auf +Fe Hoaglandagarplatten angezogen, dann für 3d auf +Fe bzw. -Fe Hoaglandagarplatten transferiert und schließlich für 6 Stunden auf +Fe Hoaglandagarplatten oder -Fe Hoaglandagarplatten jeweils mit Salizylat oder ohne Salizylat (Kont.) überführt. Blätter (B) und Wurzeln (W) wurden getrennt geerntet. Wildtyp (WT) Wurzelmaterial, das 14 Tage bei +Fe und 3 Tage bei -Fe angezogen wurde diente als Negativkontrolle. Wie bereits in zuvor beschriebenen Western Blot Experimenten (Abb. 22, Abb. 30 und Abb. 31), ist auch hier die Proteingröße des 3xHA-bHLH39 größer als errechnet, das Fehlen eines Signals in der Negativkontrolle bestätigt allerdings die Spezifität. In der Kontrolle zeigt sich für Wurzelmaterial kein Unterschied in der Proteinmenge zwischen +Fe und -Fe und bestätigt damit vorherige Ergebnisse (Abb. 30 und Abb. 31). In den Blattproben, die alle eine breitere Bande zeigen als die in Wurzeln beobachtete, zeigt sich zwischen +Fe und -Fe in der Kontrolle ebenfalls kein markanter Unterschied. Das bHLH39 Protein ist durch die konstitutive Expression in beiden Geweben unter beiden Bedingungen vorhanden und der Eisenstatus scheint auf die Proteinmenge keinen Einfluss zu haben. In Blättern kann man allerdings aufgrund der Bandenstärke annehmen, dass das Fusionsprotein in größerer Menge vorhanden ist oder in anderer Form z.B. modifiziert vorliegt und mehrere Banden ähnlicher Größe den Eindruck eines starken Signals hervorrufen. Vergleicht man die Kontrollen mit den korrespondierenden salizylsäurebehandelten Proben, zeigt sich ein geringfügiger Unterschied nur im Wurzelgewebe. Bei +Fe und bei -Fe in Wurzeln ist die Proteinmenge in salizylsäurebehandelten Wurzel leicht höher als in den jeweiligen Kontrollen. Bei -Fe ist der Unterschied etwas deutlicher, allerdings zeigt die Ponceau-S Färbung für die -Fe +SA Probe auch eine etwas höhere Proteinmenge als für die unbehandelte Kontrolle bei -Fe. Das Western Blot Experiment deutet darauf hin, dass bHLH39 in der Überexpressionslinie JM78-5 unabhängig vom Eisenstatus in Wurzeln und Blättern vorhanden ist, was mit den dargestellten Expressionsdaten übereinstimmt. Unter Einfluss von Salizylsäure lässt sich möglicherweise in Wurzeln eine leichte Zunahme der Proteinmenge feststellen, die vielleicht als Fein Anpassung der Eisenaufnahme unter bestimmten salizylsäurevermittelten Stresssituationen dienen könnte. Der Effekt von SA

Ergebnisse

auf das HA-bHLH39 Fusionsprotein scheint auf das Wurzelgewebe beschränkt und ist in diesem Versuchsaufbau sehr schwach ausgeprägt. Dieses Ergebnis wurde in 2 Experimenten bestätigt.

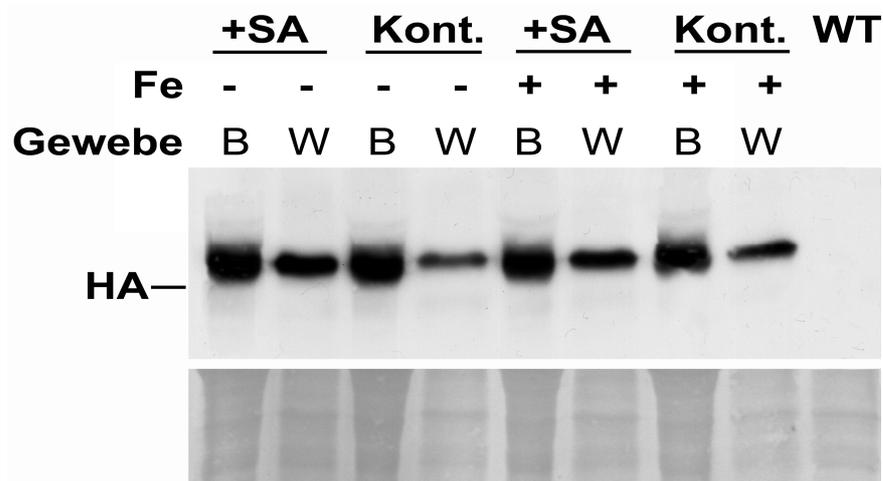


Abb. 32: Western Blot zum Test der Effekte von Salizylsäure bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung auf das HA-bHLH39 Fusionsprotein in Blättern und Wurzeln

Überexpressionspflanzen des Fusionsproteins HA-bHLH39 (Linie JM78-5) wurden für 14 Tage bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA, bezeichnet als "+Fe") auf Hoaglandagarplatten angezogen, dann für 3d auf Eisenmangelagarplatten (0 μ M FeNa-EDTA, bezeichnet als "-Fe") oder +Fe Hoaglandagarplatten transferiert und schließlich für 6 Stunden auf +Fe Hoaglandagarplatten oder -Fe Hoaglandagarplatten jeweils mit Salizylat (100 μ M SA, bezeichnet als "+SA") oder ohne Salizylat (Kont.) überführt. Blätter (B) und Wurzeln (W) wurden getrennt geerntet. Die Proteindetektion im Western Blot erfolgte mittels monoklonalem anti-HA Antikörper, dabei diente Wildtyp (WT) Wurzelmaterial, das 14 Tage bei +Fe und 3 Tage bei -Fe angezogen wurde als Negativkontrolle. Die Markierung für das HA-Fusionsprotein zeigt die erwartete Proteingröße an. Eine Ponceau-S Färbung dient als Ladekontrolle (unterer Teil der Abbildung), zusätzlich wurde die Proteinmenge mittels Bradford Assay auf 15 μ g pro Probe eingestellt

6.3 Regulation der Eisenmangelantwort durch Jasmonat (Maurer et al., 2011)

6.3.1 Expressionsanalyse der Eisenaufnahmegene unter Einfluss von Jasmonat und Ibuprofen

Auf der Suche nach Signalen, die die Eisenaufnahme beeinflussen und damit mögliche Kandidaten für systemische Eisensignale in Pflanzen darstellen, wurde das Phytohormon Jasmonat und dessen Biosyntheseinhibitor Ibuprofen in Genexpressionsexperimenten auf ihren Einfluss auf die Eisenhomöostase hin untersucht. Grundlage dieser Untersuchung sind Experimente im Wurzeltrennungssystem, die zeigen konnten, dass die Induktion der Eisenmangelantwort in der unter Eisenmangel angezogenen Wurzelhälfte nicht stattfindet, (Wang et al., 2007; Vert et al., 2003) was ein Hinweis darauf ist, dass Langstreckensignale existieren, die den Eisenstatus in einem Teil der Wurzel an entfernte Pflanzenteile melden. Jasmonat erfüllt grundlegende Kriterien die für ein solches Langstreckensignal notwendig wären, da es in der induzierten systemischen Resistenz (ISR), die typischerweise an den Wurzeln der Pflanze ausgelöst wird (Pieterse et al., 2009), zur Generierung von Langstreckensignalen durch die Vaskulatur in die übererdischen Pflanzenteile führt (Pieterse et al., 2009). Zudem war in Vorexperimenten bereits festgestellt worden, dass in *pIRT1::GUS* Pflanzen bei Eisenmangel die GUS Aktivität in Abwesenheit von Jasmonat wesentlich stärker war als in jasmonatbehandelten Pflanzen (Diplomarbeit Sabine Müller, siehe auch 3.4.1). Im Wurzeltrennungssystem wurde dann gezeigt, dass Ibuprofen einem systemischen Eisensignal, welches Induktion oder Repression der Eisenmangelgene je nach Eisenstatus hervorruft, nicht entgegenwirken kann (Diplomarbeit Sabine Müller, siehe auch 3.4.2). Um diese Ergebnisse zu bestätigen und zu testen ob die Inhibition der Eisenaufnahmegene bei Anwesenheit von Jasmonat über *FIT* abläuft, wurden WT Pflanzen für 6 Tage bei +Fe und -Fe angezogen und dann für 6h auf +Fe bzw. -Fe Hoaglandagarplatten mit 100 μ M Methyljasmonat (+MeJA) oder 10 μ M des Lipoxygenaseinhibitors Ibuprofen (+IBU) überführt. Die Kontrollpflanzen (Kontrolle) wurden auf +Fe und -Fe Platten ohne weitere Zusätze überführt (Abb. 33 A, B). Alle Proben wurden anschließend geerntet und zur Genexpressionsanalyse per qRT-PCR verwendet.

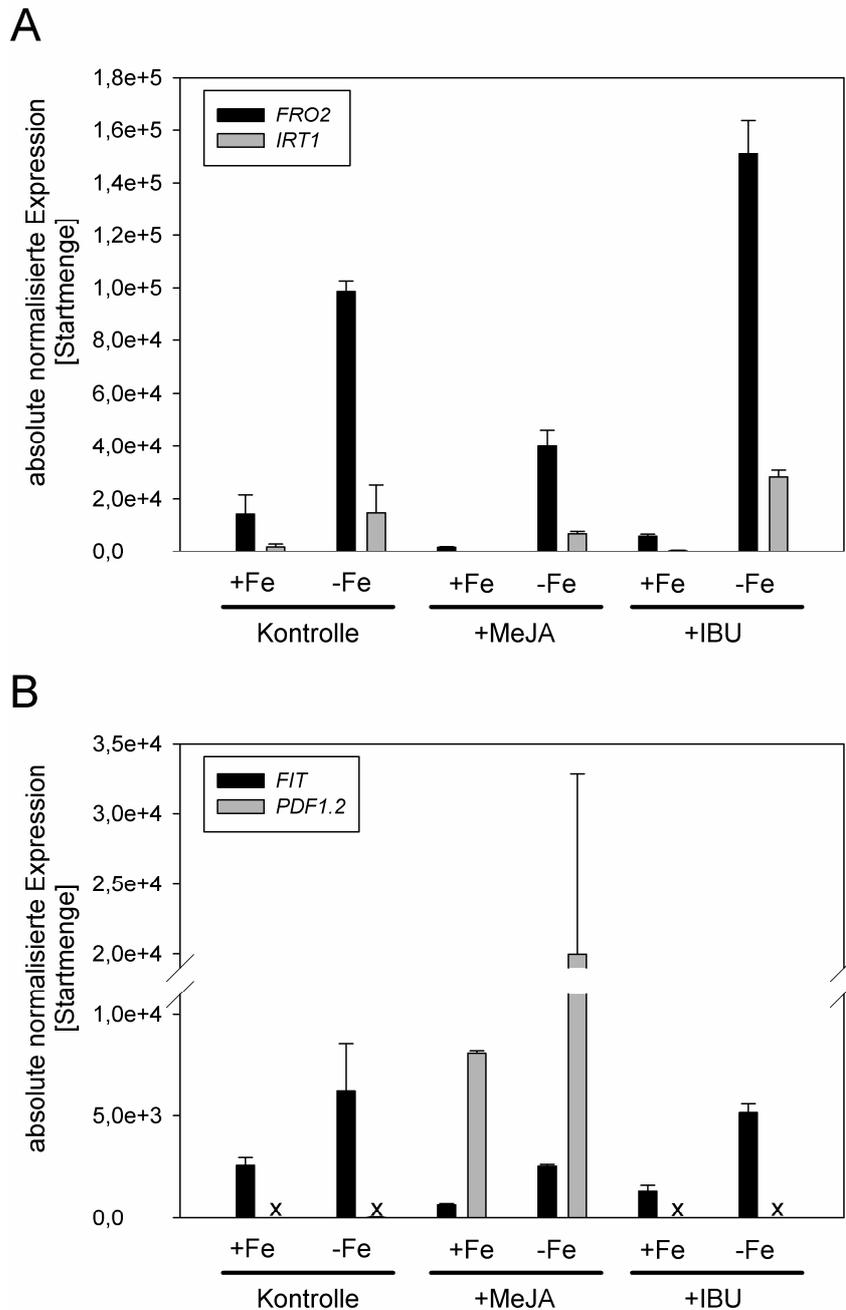


Abb. 33: Genexpressionsanalyse der Eisenhomöostasegene bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung als Antwort auf die Behandlung mit Methyljasmonat und Ibuprofen

Die Expression von *FRO2*, *IRT1* (A) und *FIT*, *PDF1.2* (B) wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Dazu wurden WT Keimlinge, für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei ausreichender Eisenversorgung (50 μM FeNa-EDTA, bezeichnet als "+Fe") oder bei Eisenmangel (0 μM FeNa-EDTA, bezeichnet als "-Fe") angezogen und dann für 6 Stunden auf +Fe bzw. -Fe Platten mit dem Zusatz von entweder 100 μM Methyljasmonat (MeJA) oder 10 μM Ibuprofen (IBU) überführt und anschließend geerntet. Die Kontrolle wurde zum Vergleich auf +Fe bzw. -Fe Hoaglandagarplatten ohne Zusätze überführt. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2.

Ergebnisse

Die Genexpressionsanalyse zeigt, dass *FIT* (Abb. 33 B) in der Kontrollbedingung bei -Fe im Vergleich zu +Fe um das 2,5fache und *FRO2* und *IRT1* (Abb. 33A) um das 7- und 8fache induziert sind. Bei Behandlung mit Methyljasmonat sind die absoluten Expressionslevel von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* bei -Fe im Vergleich zur Kontrolle um 40% reduziert (Abb. 33 A, B). Allerdings zeigt sich auch unter Einfluss von MeJA bei -Fe eine stärkere Expression von *FIT*, *FRO2* und *IRT1* als bei +Fe. Zur Kontrolle der erfolgreichen MeJA Behandlung wurde zusätzlich noch die Expression des Methyljasmonat-Antwortgens *PDF1.2* analysiert. Die *PDF1.2* Expression in diesem Versuch war nur bei MeJA Behandlung messbar und bestätigte damit die erfolgreiche Methyljasmonat Applikation. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass äußerliche Zugabe von Methyljasmonat die Expressionslevel der Eisenmarkergene in der Wurzel zwar herunter reguliert, die Induktion bei Eisenmangel allerdings nicht unterdrückt.

Um den inhibitorischen Effekt von Methyljasmonat auf die Expression der Eisenhomöostasegene zu bestätigen, wurden die Pflanzen in diesem Versuch mit 10 μ M Ibuprofen behandelt. Ibuprofen ist ein Inhibitor der Lipoxygenasen, Enzymen deren Aktivität bei der Jasmonatbiosynthese benötigt wird und dient daher in der Pflanzenforschung zur Untersuchung der Jasmonatfunktionen (Staswick et al., 1991; Zhu et al., 2006). Es stellt sich heraus, dass unter Einfluss von Ibuprofen bei -Fe ähnliche *FIT* Expressionswerte erreicht werden wie in der Kontrolle (Abb. 33 B), die Transkriptzahlen für *FRO2* und *IRT1* allerdings liegen 1,5- und 1,9fach über denen der Kontrolle. Diese Ergebnisse unterstützen daher die zuvor gemachten Beobachtungen, nach denen Jasmonat inhibitorisch auf die Gene der Eisenhomöostase wirkt und bestärkt das Resultat des Wurzeltrennungssystems in dem bereits die ibuprofenvermittelte Verstärkung der *FRO2* und *IRT1* Expression gezeigt wurde (siehe 3.4.2.).

6.3.2 Genexpressionsanalyse der Eisenmangelgene in der jasmonatresistenten Mutante *jar1-1*

Um zu testen ob ein funktionsfähiger Jasmonatsignalweg notwendig ist um die Eisenmangelantwort in Pflanzen bei +Fe zu unterdrücken, wurden die jasmonatresistente Mutante *jar1-1* zur Genexpressionsanalyse herangezogen. Das *JAR1* Gen kodiert für eine Synthase die Jasmonat-Aminosäure Konjugation katalysiert und die Verbindung von Jasmonat und Isoleucin zur aktiven Jasmonat-Ile Form bewerkstelligt (Staswick et al., 2002; Staswick und Tiriyaki, 2004). *jar1-1* Mutanten können kein Jasmonat-Ile produzieren und sind resistent gegen äußerlich zugeführtes Jasmonat (Staswick et al., 1992), daher wird die Mutante häufig verwendet um JA-abhängige Reaktionen in Pflanzen zu untersuchen (Browse, 2009). Für die Genexpressionsanalyse wurden *jar1-1* und WT Pflanzen für 6 Tage bei +Fe und -Fe angezogen und das Pflanzenmaterial zur qRT-PCR verwendet (Abb. 34 A, B). In WT Pflanzen und in der *jar1-1* Mutante sind *FRO2* und *IRT1* (Abb. 34 A) bei -Fe im Vergleich zu +Fe Bedingungen induziert. Die Mutante zeigt allerdings für *FRO2* und *IRT1* (Abb. 34A) bei -Fe im Vergleich zum WT 1,4- bzw. 1,9fach stärkere Expressionswerte, wobei bei +Fe WT und Mutante für beide Gene ähnliche Expressionsniveaus erreichten. Der übergeordnete Transkriptionsfaktor FIT ist im WT und der Mutante ähnlich reguliert (Abb. 34 B). Zusammenfassend bestätigte auch die Analyse der *jar1-1* Mutante den inhibitorischen Effekt von JA auf *FRO2* und *IRT1*, allerdings nicht auf *FIT*. Außerdem beeinflusste das Fehlen eines funktionellen Jasmonatsignalwegs in der *jar1-1* Mutante die Unterdrückung der Eisenmangelantwort bei ausreichender Eisenversorgung nicht.

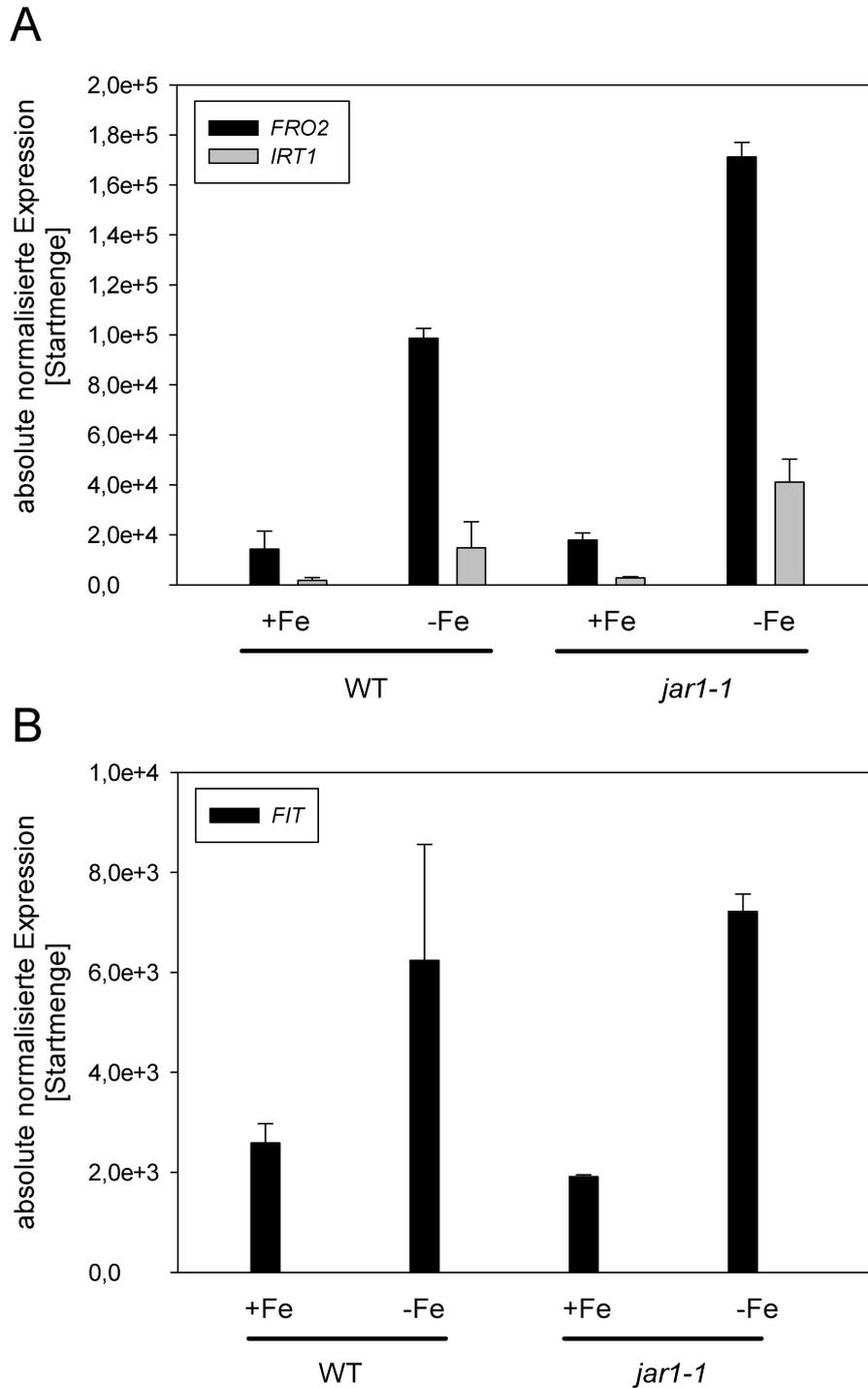


Abb. 34: Genexpressionsanalyse von Eisenhomöostasegenen in der *jar1-1* Mutante

jar1-1 Mutanten und WT Pflanzen wurden für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei Eisenmangelbedingungen (0 μ M FeNa-EDTA) und ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA) angezogen. Die Expression von *FRO2*, *IRT1* (A) und *FIT* (B) wurde in ganzen Keimlingen mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, n=2.

6.3.3 Genexpression in der *fit* Mutante bei Behandlung mit Jasmonat

FIT ist ein zentraler Regulator für *FRO2* und *IRT1* (Bauer et al., 2007; Colangelo und Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005). Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten klar den negativen Effekt von JA auf die *FIT* Expression, allerdings produziert die JA Mutante *jar1-1* *FIT* Transkripte auf WT Level (Abb. 34 B). Um zu klären ob die Repression von *FRO2* und *IRT1* durch Jasmonat von FIT abhängig ist, wurden WT und *fit* Mutanten Pflanzen für 6 Tage bei +Fe und -Fe angezogen, mit 0 μ M oder 100 μ M Methyljasmonat (+MeJA) behandelt und das Pflanzenmaterial zur qRT-PCR verwendet (Abb. 35).

Das Experiment zeigt reduzierte *FRO2* und *IRT1* Expression für die *fit* Mutante bei +Fe und -Fe im Vergleich zum WT. Eine Induktion bei Eisenmangel auf die etwa dreifache Transkriptmenge ist allerdings auch hier zu beobachten (Abb. 35). Bei der Zugabe von Methyljasmonat ist der Expressionslevel in der Mutante allgemein sehr niedrig und eine Induktion bei -Fe ist nicht mehr sichtbar. Zusammenfassend kann man daraus folgern, dass Methyljasmonat die Genexpression von *FRO2* und *IRT1* unabhängig von *FIT* inhibieren. Möglicherweise reprimiert JA auch einen unbekanntem Mechanismus der die *FRO2* und *IRT1* Induktion in der *fit* Mutante aufrechterhält. Die Ergebnisse bestätigen dass *FRO2* und *IRT1* stärker von JA beeinflusst werden als *FIT*.

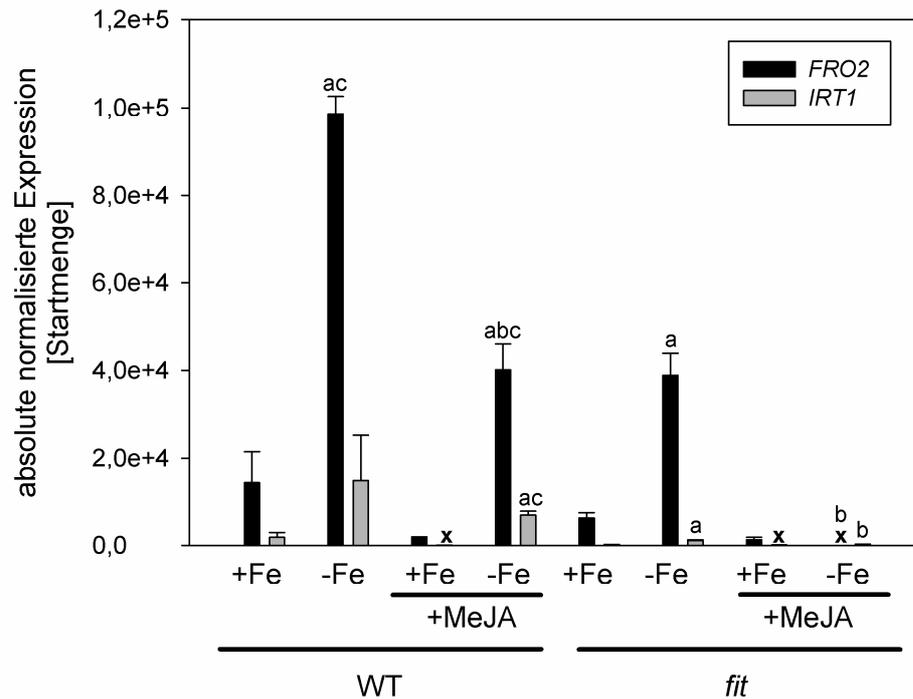


Abb. 35: Genexpressionsanalyse von Eisenaufnahmegenen in der *fit* Mutante bei Eisenmangel und ausreichender Eisenversorgung als Antwort auf die Behandlung mit Methyljasmonat

Die Expression wurde mittels quantitativer Real Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Dazu wurden Keimlinge, für 6 Tage auf Hoaglandagarplatten bei ausreichender Eisenversorgung (50 μ M FeNa-EDTA, bezeichnet als "+Fe") oder bei Eisenmangel (0 μ M FeNa-EDTA, bezeichnet als "-Fe") angezogen und dann für 6 Stunden auf +Fe bzw. -Fe Platten mit dem Zusatz von 100 μ M Methyljasmonat (MeJA) oder ohne Zusatz überführt und anschließend geerntet. Die absolute Expression wurde gegen die Kontrolle normalisiert, so wie in "Material und Methoden" beschrieben. Die angezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsabweichung, $n=2$. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen +Fe und -Fe Bedingung eines Genotyps sind mit einem "a" markiert, signifikante Unterschiede zwischen MeJA behandelten und unbehandelten Proben eines Genotyps bei gleicher Bedingung sind mit „b“ gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen WT und Überexpressionslinie der gleichen Bedingungen sind mit einem "c" gekennzeichnet (wenn gilt $p < 0.05$, geprüft per T-Test für unabhängige Stichproben).

6.3.4 Analyse der jasmonatinsensitiven Mutante *coi1-1* im Wurzeltrennungssystem

Um die vorherigen Ergebnisse des Wurzeltrennungssystems zu untermauern (siehe 3.4.2), die besagen, dass JA tatsächlich nicht als ein systemisches Signal dient, welches in der *-/* Wurzelhälfte die Eisenmangelantwort unterdrückt, wurde die jasmonatinsensitive Mutante *coi1-1* im Wurzeltrennungssystem angezogen und zur Genexpressionsanalyse verwendet. Wenn JA also tatsächlich nicht als systemisches supprimierendes Signal dient, wäre genau wie im WT in der *-/* Wurzelhälfte eine schwächere Expression von *FRO2* und *IRT1* zu erwarten als in der *-/-* Probe. Die *coi1-1* Mutante wurde für dieses Experiment ausgewählt, da sie aufgrund einer Knockout Mutation im Jasmonatrezeptor COI1 vollkommen jasmonatinsensitiv ist (Chini et al., 2007; Chung et al., 2009; Fonseca et al., 2009; Thines et al., 2007; Yan et al., 2009). Die Analyse der *+/+* Proben im Vergleich zu den *-/- coi1-1* Pflanzen zeigt, dass *FRO2* (Abb. 36 B) und *IRT1* (Abb. 36 A) 2,5 und 2,8fach stärker auf das Eisenmangelsignal reagieren als im WT (Abb. 36AB). Dieses Kontrollexperiment bestätigt erneut, dass JA negativ auf die *FRO2* und *IRT1* Genexpression wirkt. In den *-/* Proben der *coi1-1* Mutante konnte keine erhöhte Induktion der Genexpression im Vergleich zum WT gezeigt werden (Abb. 36 A, B). Daher kann klar festgestellt werden, dass das systemische Signal für ausreichende Eisenversorgung auch in der *coi1-1* Mutante vollständig intakt ist. JA dient also tatsächlich nicht als systemisches Signal welches in der *-/* Wurzelhälfte die Eisenmangelantwort unterdrückt.

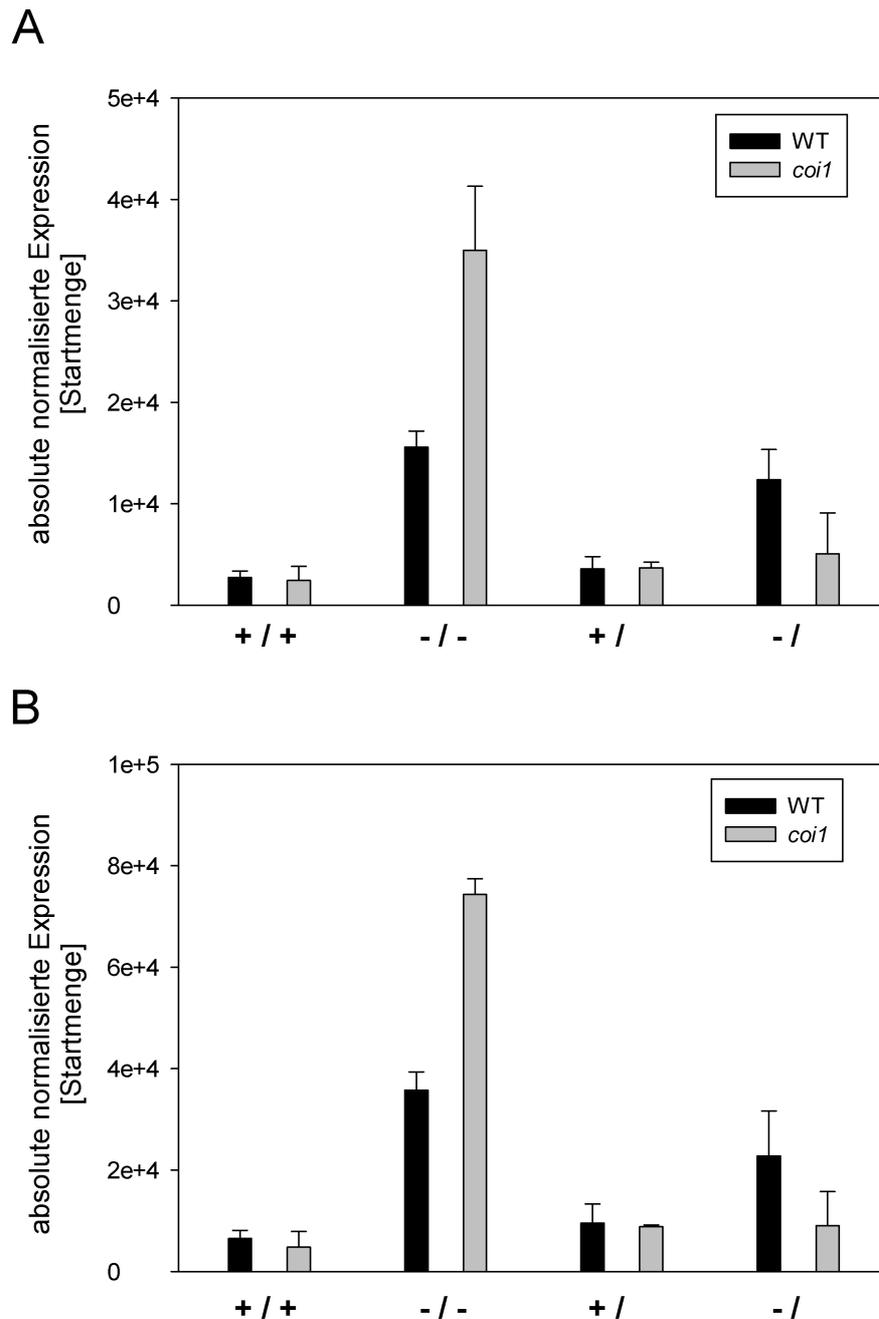


Abb. 36: Genexpressionsanalyse der *coi1-1* Mutante im Wurzeltrennungssystem

Die Expression von *IRT1* (A) und *FRO2* (B) in Wurzeln wurde mittels quantitativer Real-Time Reverse Transkriptase-PCR untersucht. Dazu wurden im Wurzeltrennungssystem (siehe Material und Methoden) angezogene WT und *coi1-1* Pflanzen für 3 Tage auf dreigeteilten Platten mit folgenden FeNa-EDTA Konzentrationen transferiert: 100 μ M/ 100 μ M (+/+ Kontrolle), 0 μ M /0 μ M (-/- Kontrolle), 100 μ M /0 μ M (+/ für die 100 μ M Seite; -/ für die 0 μ M Seite)

7. Diskussion

7.1 *BHLH38* ist zur Aufrechterhaltung der Eisenaufnahme ausreichend

Die *3xbhlh* Mutante kann mit *BHLH38* als letztem aktivem Gen der bHLH Untergruppe Ib(2) die Gene der Eisenmangelantwortgene *FIT*, *FRO2* und *IRT1* bei Eisenmangel auf WT Niveau induzieren und auch die Aktivität von *FRO2* und *IRT1* entspricht der des WT (Abb. 9 und Abb. 10). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass zumindest *BHLH38* und *BHLH39*, von denen man annimmt dass sie mit *FIT* zusammen *FRO2* und *IRT1* induzieren, in diesem Aspekt funktionell redundant sind, sodass *BHLH38* alleine zur Induktion der Eisenmangelantwort ausreichend ist. Dabei ist *BHLH38* in der Mutante in Wurzeln unter +Fe und unter -Fe Bedingungen stärker exprimiert als im WT (Abb. 8), was bei -Fe wahrscheinlich dazu dient die Proteinmenge aufrechtzuerhalten, die zur Aktivität des Heterokomplexes notwendig ist, da das Fehlen des bHLH39 Proteins kompensiert werden muss. Im WT ist es wahrscheinlich dass bHLH38 und bHLH39 bei -Fe ständigem Proteinabbau und Proteinneusynthese unterzogen sind, die dann in der Mutante mit nur einem funktionsfähigem Ib(2) bHLH eine hohe Transkriptmenge erfordern. Da sich Mutante und WT in der Eisenaufnahme nicht signifikant unterscheiden, basiert der Phänotyp der Mutante möglicherweise auf Stressreaktionen, die von lang anhaltendem Eisenmangel ausgelöst werden und durch das Fehlen der bHLH Transkriptionsfaktoren gravierender sind als im WT. Dabei ist nicht sicher ob hier die Abwesenheit von *BHLH100* und *BHLH101* für die phänotypischen Veränderungen verantwortlich ist, da das andere Homologpaar durch *BHLH38* vertreten wird. Da Einzelmutanten keinen Phänotyp zeigen und keine Funktionen für die Ib(2) bHLHs bekannt sind, außer der Komplexbildung von bHLH38 und bHLH39 mit *FIT* zur Induktion von *FRO2* und *IRT1* bei Eisenmangel, ist bisher generell unklar ob *BHLH38/39* und *BHLH100/101* zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen bilden, oder ob diese generell redundant sind. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bHLH38 und bHLH39 höchst wahrscheinlich wenigstens in ihren Funktionen für die Induktion der Eisenmangelantwort redundant sind, während die Rolle von bHLH100/101 noch näher untersucht werden muss.

7.2 Transkriptomanalyse der *3xbhlh* Mutante zeigt veränderte Expression von eisensensitiven Genen in Übereinstimmung mit der *fit* Mutante und induziert im Vergleich zur *ein3/eil1* Mutante

Die *3xbhlh* Mutante zeigt zwar keine Deregulation der Gene der Eisenaufnahme, allerdings konnten mit der Mikroarrayexpressionsanalyse 6 Gene gefunden werden, die in der *3xbhlh* Mutante sowie in der Eisenhomöostasemutante *fit* bzw. in der Ethylensignalmutante *ein3/eil1* signifikant dereguliert sind und deren Funktionen bisher nicht klar sind. Dabei handelt es sich um den MATE Transporter *F3L12.12* (At2g04050) und die beiden unbekanntenen Gene *T15J14.6* (At2g15020) und *T2E22.34* (At3g12320), die bei -Fe in der *3xbhlh* gegenüber dem WT hochreguliert und interessanterweise in der *ein3/eil1* Mutante herunter reguliert sind (Ivanov et al., 2011; Lingam et al., 2011). Obwohl diese Gene nicht direkt mit der Eisenhomöostase in Verbindung gebracht werden, ist aufgrund der bekannten Regulation der Eisenaufnahme durch das Hormon Ethylen und der Deregulation dieser Gene in der *ein3/eil1* Mutante anzunehmen, dass sie zumindest teilweise von der Eisenhomöostase beeinflusst werden oder diese beeinflussen. Das Gen *F3L12.12* (At2g04050) ist ein MATE Transporter, die allgemein in Pflanzen zum Transport niedrigmolekularer organischer Moleküle dienen und auch zur Entfernung oder Einlagerung von aufgenommenen oder metabolisierten toxischen Substanzen beitragen (Li et al., 2002). Die Gegensätzlichkeit der Deregulation in der *3xbhlh* Mutante und *ein3/eil1* könnte ein Hinweis darauf sein, dass die bHLHs und *EIN3/EIL1* mit deren induzierenden Signalen antagonistische Effekte auf die deregulierten Gene haben. Da *EIN3/EIL1* bei Eisenmangel wahrscheinlich durch physische Interaktion das FIT Protein stabilisieren und damit positiv auf die Transkription der Eisenaufnahmegene wirken (Lingam et al., 2011) und bHLH38/39 als Teil des Heterokomplexes ebenfalls positiv auf die Eisenmangelantwort wirken (Yuan et al., 2008), ist der Grund für die unterschiedliche Transkription der deregulierten Gene wahrscheinlich unabhängig vom FIT/bHLH Heterokomplex und seinen Zielgenen zu finden, sondern eher bei einzeln von den bHLH- und *EIN3/EIL1*- Signalweg regulierten Genen im Zusammenhang der Eisenhomöostase. Da *BHLH38/39* wie bereits beschrieben in ihren Funktionen wahrscheinlich hoch redundant sind, könnte man sogar die Hypothese aufstellen, dass diese drei deregulierten Gene eher über *BHLH100/101*

Diskussion

negativ reguliert werden und sie daher in der Mutante induziert sind. Dabei läuft die Regulation der bHLHs selbst über ein bisher unbekanntes Eisenmangelsignal ab. Ein Modell zu dieser Hypothese ist in Abb. 37 dargestellt. Um weitere Hinweise über die Funktionen der bHLHs zu sammeln wäre eine nähere Untersuchung der Gene *At2g04050*, *At2g15020* und *At3g12320* in der Zukunft sehr wahrscheinlich aufschlussreich. Dabei ist besonders der MATE Transporter interessant, da ein anderes Mitglied der MATE Transporter Familie, *FRD3* benannt, eine wichtige Rolle in der Eisenhomöostase von *Arabidopsis thaliana* spielt. *FRD3* gibt Ziträt in die Vaskulatur der Wurzel ab (Durrett et al., 2007), wobei man annimmt dass sich Eisen-Ziträt Komplexe bilden, die den Eisenlangstreckentransport in die Blätter bewerkstelligen (Green und Rogers, 2004; Rogers und Guerinot, 2002). Die Induktion des Transporters *At2g04050* in der Mutante könnte verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise werden mehr organische Moleküle transportiert, die ebenfalls mit dem Eisentransport in Verbindung stehen oder es findet ein erhöhter Transport von toxischen Metaboliten statt die durch Stressreaktionen in der Mutante vermehrt produziert werden.

Die drei Gene *CYP82C4*, *COBL6* und *MLP3.17* sind in der *3xbhlh* Mutante bei –Fe schwächer exprimiert als im WT. Für die beiden Gene *CYP82C4* und *MLP3.17* ist bekannt, dass sie durch Eisenmangel induziert werden (Colangelo und Guerinot, 2004; Buckhout et al., 2009; Ivanov et al., 2011). Für beide Gene wurde mittels Mikroarray Transkriptomanalyse in einer Publikation über die *fit* Mutante eine signifikant schwächere Expression bei –Fe in der Mutante festgestellt (Colangelo und Guerinot, 2004). *CYP82C4* kodiert für ein Cytochrom P450, von dem man annimmt, dass es in die frühe Eisenmangelantwort involviert ist und bei Eisenmangel *FIT* abhängig induziert wird, wobei die Expression zusätzlich einem tageszeitabhängigen Rhythmus unterworfen ist (Colangelo und Guerinot, 2004; Murgia et al., 2011). Das andere Gen *MLP3.17* ist ein Protein der Galaktose Oxidase/Kelch Familie mutmaßlich mit der Funktion des Eisentransports und der Vermittlung erhöhter Toleranz gegen Metalle (Ivanov et al., 2011). *CYP82C4*, *MLP3.17* und *COBL6* sind in der *3xbhlh* Mutante bei –Fe genau wie in der *fit* Mutante bei –Fe schwächer exprimiert als im WT, da die Regulation allerdings nur in der *fit* Mutante nicht aber in der *3xbhlh* Mutante auf Eisenmangel zurückgeführt werden kann, ist der zugrundeliegende Defekt der auf beide Mutanten zutrifft das Fehlen eines Heterokomplexes aus *FIT* und bHLH39 bzw. bHLH100 oder bHLH101. Daher ist es möglich, dass die Gene *CYP82C4*, *COBL6* und

Diskussion

MLP3.17 bei Eisenmangel durch einen Heterokomplex aus FIT und bHLH39 bzw. wenn existent bHLH100 oder bHLH101 positiv transkriptionell reguliert werden. Ein Modell zu dieser Hypothese ist in Abb. 37 zu sehen.

Welche Funktion *CYP82C4* genau hat ist nicht bekannt, beim Ausschalten des Gens in der T-DNA Mutante *atc82c4-1* können allerdings bei ausreichender Eisenversorgung stets längere Wurzeln als im WT beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Abwesenheit von *CYP82C4* in der Mutante permanenten Eisenmangel signalisiert (Murgia et al., 2011). Daher spielt *CYP82C4* möglicherweise eine Rolle in der Generierung und Weiterleitung von Eisenmangelsignalen in der Wurzel bis hin zu Zielgenen die Einfluss auf die Wurzelmorphologie haben, was ebenfalls für *BHLH39* aus hier gezeigten Genexpressionsexperimenten wie auch den stark verkürzten Wurzeln der *BHLH39* Überexpressionspflanzen vermutet werden kann (Abb. 25, Abb. 26, Abb. 28 und Abb. 29). Die Induktion von *CYP82C4* über einen FIT/bHLH Heterokomplex bei Eisenmangel, könnte dazu dienen den Eisenmangel an andere Zielgene zu signalisieren, die unter anderem zu morphologischen Veränderungen, wie z.B. Wurzelwachstum zur Erschließung neuer Nährstoffvorkommen beitragen. Das in der *3xbhlh* Mutante bei Eisenmangel ähnlich wie *CYP82C4* regulierte *COBL6*, spielt vielleicht ebenfalls eine Rolle darin die Eisenversorgung der Pflanze durch Wurzelwachstum zu verbessern, da die Funktionen von *COBL6* zwar bisher unbekannt sind, allerdings starke Sequenzhomologien zu *COBRA*, einem zentralen Regulator der Zellexpansion in Wurzeln, festgestellt wurden (Schindelman et al., 2002). *COBRA* codiert mutmaßlich für ein Glykosylphosphatidylinosit-(GPI)-Ankerprotein mit der Funktion die Richtung der Zellexpansion in Wurzelzellen zu regulieren (Ko et al., 2006). Die Induktion der Transkription von *CYP82C4* und *COBL6* durch einen FIT/bHLH Heterokomplex bei Eisenmangel zum Wurzelwachstum hätte eine vergrößerte Wurzeloberfläche und das Erschließen neuer Substratbereiche zur Folge, was die Möglichkeiten zur Eisenaufnahme verbessert.

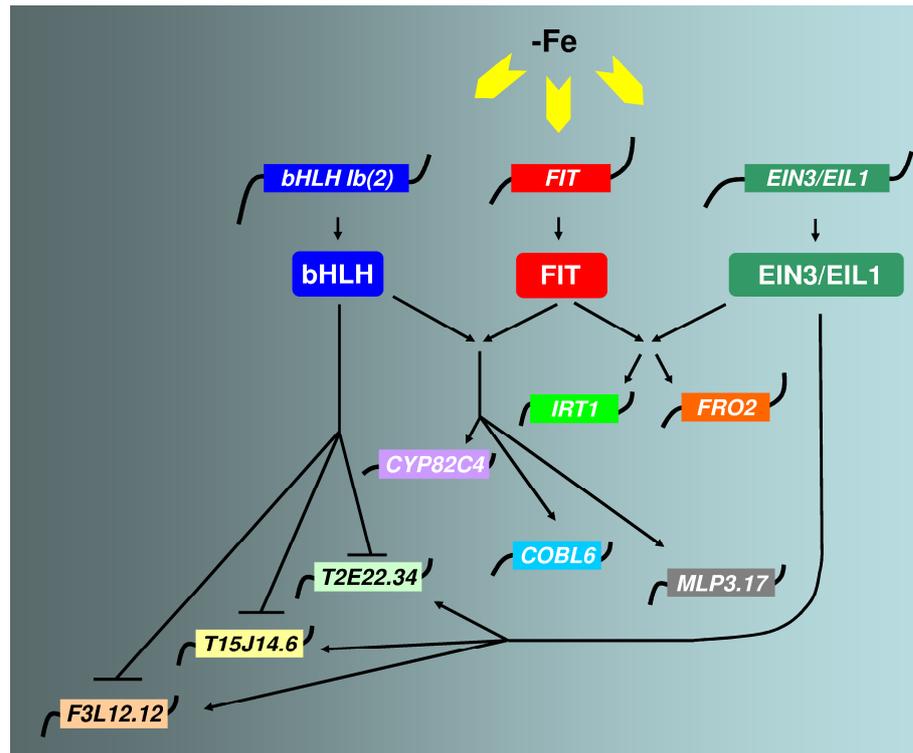


Abb. 37: Modell zur wildtypischen Regulation von Genen im Zusammenhang der Eisenhomöostase, die in der *3xbhlh* Mutante unterschiedlich zu *ein3/eil1* und dem WT exprimiert sind

Eisenmangel induziert die Transkription der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren, von *FIT* und *EIN3/EIL1*. *EIN3/EIL1* interagiert mit *FIT* und beeinflusst dessen Proteininstabilität. Bei Eisenmangel wird über *FIT* die *IRT1* und *FRO2* Transkription induziert. Nach Ergebnissen der Mikroarrayexpressionsstudie in der *3xbhlh* Mutante induziert der Heterokomplex aus bHLH38 bzw. bHLH39 und *FIT* möglicherweise *MLP3.17*, *CYP82C4* und *COBL6* bei Eisenmangel. Außerdem scheinen die bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren alleine bei Eisenmangel einen negativen Effekt auf die Genexpression von *F3L12.12* (At2g04050), *T15J14.6* (At2g15020) und *T2E22.34* (At3g12320) zu haben, während der *EIN3/EIL1* Signalweg wahrscheinlich antagonistische Effekte auf diese Gene hat.

7.3 SA kann die Expression der Eisenaufnahmegene nicht induzieren

Um zu klären ob SA als internes Signal der Eisenmangelantwort fungiert, wurde getestet, ob das Phytohormon SA die Gene der Eisenaufnahme über *OBP3* und *BHLH38/39* modulieren kann (Abb. 15). Da das systemisch wirkende SA (Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990) in vielen Prozessen als Antagonist der Jasmonsäure agiert (Doherty et al., 1988; Pena-Cortes et al., 1993; Doares et al., 1995) für das in dieser Arbeit ein reprimierender Effekt auf die Eisenaufnahmegene gezeigt wurde (siehe 7.12 und Maurer et al., 2011), wurde überprüft, ob die Eisenmangelantwortgene bei äußerlicher Zugabe von SA verstärkt exprimiert werden. Zuerst wurde in Übereinstimmung mit vorherigen Publikationen für das bestehende Anzuchtssystem gezeigt, dass bei +Fe Bedingungen im WT *OBP3* und *BHLH38* (Abb. 15) durch SA induziert werden (Kang und Singh, 2000; Kang et al., 2003). Allerdings war das Niveau der Transkriptzunahme weit unter dem der Eisenmangelinduktion, wobei die verwendete SA Konzentration, gemessen an der Expression des SA Markergens *PRI*, effektiv war. Bei -Fe Bedingungen war eine signifikante SA abhängige Induktion nur noch für *OBP3* messbar, das selbst zusätzlich durch den Eisenmangel induziert wurde. *BHLH38* zeigte beim gleichzeitigen Auftreten von Eisenmangelreiz und Salizylsäurebehandlung nur eine unwesentlich höhere Expression als bei Eisenmangel alleine. Es wäre möglich, dass SA als mögliches Eisenmangelsignal eine vollständige Induktion von *BHLH38* nur unter +Fe Bedingungen erzielen kann, da äußerlich zugeführtes SA und systemisches SA sich möglicherweise nicht addieren und nur zu einem möglichen Expressionsmaximalwert führen können. Dem widerspricht allerdings die schwache *BHLH38* Induktion bei +Fe +SA. Außerdem zeigen *FIT*, *FRO2* und *IRT1* unabhängig von der Eisenversorgung keine signifikante Erhöhung der Expression durch die Salizylsäurebehandlung (Abb. 16) und in Expressionsstudien mittels qRT-PCR für die SA Biosynthesemutante, *sid2* (Wildermuth et al., 2001), die SA Akkumulationsmutante *NahG* (Friedrich et al., 1995) und die SA Signalwegmutante *npr1* (Pieterse und Van Loon, 2004) konnte bei -Fe keinerlei Beeinträchtigung in der Eisenmangelantwort beobachtet werden. Offensichtlich ist die Induktion der Eisenmangelantwortgene *FRO2* und *IRT1*, über *BHLH38/39* zusammen mit *FIT* also nicht von der SA-Biosynthese, der SA-Akkumulation oder dem SA-Signalweg über *NPR1* abhängig. Die Eisenmangelantwort wird also auf Transkriptlevel nicht von SA beeinflusst. Fasst man alle Beobachtungen zusammen,

konnte nicht gezeigt werden, dass SA als Signal zur positiven oder negativen Regulation der Eisenmangelantwort dient. Da das systemisch wirkende Phytohormon SA also nicht als internes Langstreckensignal der Eisenmangelantwort fungiert, stellt sich die Frage welche Funktion die SA vermittelte Induktion von *OBP3* und *BHLH38/39* bei +Fe in der Pflanze hat. SA gehört zu den Phytohormonen, die sowohl in spezifischen Abwehrreaktionen (Jane Glazebrook, 2005), als auch als Regulatoren von abiotischen Stressreaktionen eine Rolle spielen (Miura und Ohta, 2010; Larkindale und Knight, 2002; Larkindale et al., 2005; Gunes et al., 2007), daher wäre es möglich, dass die Expression von Genen der Eisenhomöostase mit der von Abwehr bzw. Stressgenen verknüpft ist um die Eisenverteilung in der Pflanze der jeweiligen Stress oder Abwehrbedingung anzupassen. Eine solche Beteiligung der bHLHs der Untergruppe Ib(2) in der Reorganisation des Eisens bei bestimmten Stress bzw. Abwehrreaktionen in der Pflanze wurde in einer Transkriptomanalyse untersucht und wird im Abschnitt 7.4 detailliert diskutiert.

7.4 Transkriptomanalyse der *3xbhlh* Mutante zeigt veränderte Regulation von Seneszenz- und Abwehrgenen des Salizylsäurenetzwerks

Mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, dass die bHLHs der Untergruppe Ib(2) mit dem Stress- und Pathogennetzwerk in Verbindung stehen, dass teilweise über das Phytohormon Salizylsäure geregelt wird. Zum einen sind *BHLH38* und *BHLH39* bei +Fe durch SA induzierbar (Kang und Singh, 2000; Kang et al., 2003), ohne dass SA allerdings die putativen Zielgene *FRO2* und *IRT1* auf Transkriptlevel positiv beeinflusst. Außerdem zeigt die *3xbhlh* Mutante in der qRT-PCR Analyse wiederholt reduzierte Expressionslevel des SA Markergens *PRI* bei Eisenmangel unter äußerlicher Zugabe von SA (Abb. 15). In der Mikroarray Expressionsanalyse war dieser Effekt nicht sichtbar, allerdings konnte bei -Fe eine reduzierte *PR5* Expression (Abb. 18, Gruppe II und Abb. 19, Gruppe II) und eine signifikant reduzierte Expression des putativen *PRI*, *PR2* und *PR5* Koaktivators *WRKY70* (Abb. 18, Gruppe II und Abb. 19, Gruppe II) festgestellt werden, der mutmaßlich teilweise *NPRI* und salizylsäureabhängig induziert

Diskussion

wird (Li et al, 2004). Daher besteht die Möglichkeit, dass SA, möglicherweise über *OBP3* als transkriptionellen Aktivator, *BHLH38* und *BHLH39* induziert und diese direkt oder indirekt Einfluss auf die Transkriptionsregulation von *WRKY70*, *PR1* und *PR5* haben (Abb. 38). Der Ausgangspunkt dieser SA-abhängigen hypothetischen Signalkette ist mutmaßlich *OBP3*. Das SA induzierbare *OBP3* gehört zu den Dof (DNA binding with one finger) Proteinen die eine Zinkfinger DNA-Bindedomäne besitzen (Kang und Singh, 2000). Mit dieser kann *OBP3* sequenzspezifisch an das OBP-Bindemotif (A/T)AAAG bzw. CTTT(T/A) in Promotorregionen binden und über eine C-terminale Aktivierungsdomäne die Transkription aktivieren (Kang und Singh, 2000), sie ermöglicht aber auch Protein-Protein Interaktionen (Yanagisawa, 2004). Da die Expressionslevel von *BHLH38* und *BHLH39* in *OBP3* KO Linien reduziert sind und mittels eines induzierbaren *OBP3* Promotorsystems gezeigt werden konnte, dass die *OBP3* Expression dem Anstieg der *BHLH38/39* Expression vorrausgeht, wird angenommen, dass *OBP3* als positiver Regulator der beiden Gene fungiert (Kang et al., 2003). Möglicherweise läuft die transkriptionelle Aktivierung von *BHLH38/39* dabei über das OBP-Bindemotif ab, da es in den Promotoren beider Gene jeweils zehnmal auftritt und damit überdurchschnittlich häufig vertreten ist (Kang et al., 2003).

Die signifikant reduzierte Expression von *WRKY70*, *PR1* und *PR5* in der *3xbhlh* Mutante könnte also auf das Fehlen der bHLHs in der Signalkette zur Induktion der Transkription dieser Gene oder deren Aktivatoren zurückzuführen sein. Eines der möglichen Zielgene, *WRKY70*, ist ein WRKY Transkriptionsfaktor der mit Pathogenabwehr und Blattseneszenz in Verbindung gebracht wird. Blattseneszenz ist der letzte Reifungsschritt des Pflanzenorgans, der durch Chloroplasten-, Protein-, Lipid, Nährstoff und Nukleinsäureabbau begleitet wird (Gepstein, 2004; Quirino et al., 2000). Im Zug dieser Reifung werden in verschiedenen Stufen spezielle seneszenzassoziierte Gene (SAG) exprimiert (Oh et al., 1997; Yoshida et al., 2001). Die Kontrolle dieser Prozesse wird von inneren und äußeren Faktoren geprägt, wobei eine Vielzahl von Phytohormonen ein Netzwerk zur Regulation bilden (Gepstein, 2004). Hier überschneiden sich Seneszenz und Pathogenabwehrnetzwerk (Grbic und Bleecker, 1995; He et al., 2002; Morris et al., 2000). Die drei Phytohormone SA-, JA- und ET sind sowohl Teil spezifischer Abwehrreaktionen (Glazebrook, 2005) als auch Regulatoren der Blattseneszenz (Buchanan-Wollaston et al., 2005; Morris et al., 2000). Eine Induktion der Abwehrgene *PR1*, *PR2*, *PR3* und *PDF1.2* während der Blattseneszenz (Hanfrey et al., 1996; He et al., 2002; Morris et al., 2000; Quirino et al., 2000) ist unter dem Namen altersvermittelte

Resistenz bekannt (Kus et al., 2002) und könnte physiologisch den Sinn haben das strukturell geschwächte Blatt bis zum Abschluss der Ressourcenrückgewinnung vor Pathogenen zu schützen. Da Seneszenz und Pathogenabwehr Verbindungspunkte aufzeigen, wurde von Zhang et al. in der Publikation von 2010 untersucht ob *WRKY70* Abwehrgene induziert. Dazu wurde in der *snc2-1D* Mutante (suppressor of *npr1-1*, constitutive 2), die Abwehrgene konstitutiv exprimiert, eine *WRKY70* loss of function Mutation hervorgerufen, die zur Unterbrechung der konstitutiven Expression führte. Dem entgegen stehen die Ergebnisse von Ulker et al. 2007 die zeigen dass *WRKY70* als Repressor von SA-abhängig regulierten Genen wie *PR1*, *PR2* und *PR3* fungiert. Insgesamt ist also die Art der Verbindung zwischen PR Genen und *WRKY70* unzureichend bekannt, allerdings zeigt sich deutlich ein Zusammenhang zwischen beiden Gruppen.

Klar ist, dass die *WRKY70* Expression nicht nur von SA selbst, sondern auch teilweise von der SA Signalweiterleitung über *NPR1* abhängig ist (Ulker et al., 2007), ähnlich wie auch *PR1* und *PR5* (Glazebrook et al., 2003), da in der *npr1* Mutante die *WRKY70* Expression stark reduziert ist, während in NahG Pflanzen keine messbare *WRKY70* Expression mehr stattfindet (Ulker et al., 2007). Daher erklärt sich auch, dass eine differentielle Expression von *WRKY70* und *PR5* in der *3xbhlh* nur unter –Fe festgestellt werden konnte, wenn nur der Signalweg über die fehlenden bHLHs die beiden Gene aktivieren kann, während bei –Fe +SA zusätzlich eine Aktivierung über SA und *NPR1* möglich ist (Abb. 38). Da die anderen beiden mutmaßlichen Zielgene von *WRKY70*, *PR2* und *PR3*, in der *3xbhlh* nicht betroffen sind, läuft deren Regulation vermutlich zusätzlich noch über andere Faktoren ab.

Über die Funktion der 4 bHLHs der Untergruppe Ib(2) in diesem Teil des SA Netzwerks ist nichts bekannt. Zusammenhänge zwischen Eisenhomöostase und Blattseneszenz waren allerdings bereits dadurch gezeigt worden, dass sich die Expression der FERRITIN1 Transkripte während der Blattseneszenz stark erhöht, möglicherweise um freiwerdendes Eisen zu binden. Murgia et al. konnten dann 2007 zeigen, dass Mutanten des Eisenspeicherproteins FER1 tatsächlich einen wesentlich schnelleren Blattseneszenzverlauf zeigen, als der WT. Physiologisch könnte es für die Pflanze notwendig sein die Expression von Genen der Eisenhomöostase mit der von Abwehrgenen zu verknüpfen. Einerseits muss nämlich das geschwächte Blatt vor Pathogenen geschützt werden, andererseits steht das in der Blattseneszenz freiwerdende Eisen wieder anderweitig zur Verfügung und muss aufgrund seiner enormen

Wichtigkeit, aber auch Toxizität für die Pflanze, äußerst reguliert zu neuen Bedarfsorten transportiert werden. Eine solche Reorganisation des Eisenpools bedarf vieler Regulationsmechanismen. Möglicherweise spielen die bHLHs der Untergruppe Ib(2) aufgrund ihrer eisenabhängigen Regulation eine Rolle als Knotenpunkte zwischen Seneszenz und Eisenumverteilung. Obwohl der *3xbhlh* Phänotyp auch in jungen Blättern auftritt, könnte eine Deregulation der Eisenneuverteilung aus Blättern ein Grund für die starke Chlorose der Mutante bei Eisenmangel sein und die bereits beschriebene (siehe auch 7.2) signifikante Induktion des potentiellen Eisentransporter der MATE Familie (At2g04050) könnte Teil einer solchen deregulierten Eisenneuverteilung sein. In WT Pflanzen erreicht Eisen adulte Blätter über das Xylem, sich entwickelnde junge Blätter werden allerdings aufgrund des noch nicht vollständig ausgebildeten Xylems über das Phloem mit Eisen versorgt (Curie et al., 2009). In seneszierenden Blättern wird dieser Vorgang umgekehrt und Eisen wird remobilisiert und zu den Bedarfsorten in anderen Blättern oder Geweben transportiert. Dazu müssen die Gewebe an denen das Element benötigt wird über ein bisher unbekanntes Signal angezeigt werden und eine transkriptionelle Aktivierung von Genen zur Freisetzung, Chelatierung, Transport und Speicherung muss erfolgen, um zu gewährleisten, dass Eisen den Bedarfsort erreicht ohne die Pflanze zu schädigen. Gleichzeitig ist es erforderlich dass die seneszierenden Zellen so lange wie möglich lebensfähig bleiben, um einen möglichst kompletten Abbau aller Ressourcen zu ermöglichen. Ein möglicher Knotenpunkt zwischen transkriptioneller Regulation von eisenabhängig regulierten Genen und abwehrspezifischen Genen könnten die bHLH Ib(2) Gene sein.

Eine ähnliche Funktion hat möglicherweise der Transkriptionsfaktor RAP 2.9 auch bekannt als DEAR5 (DREB und EAR Motif Protein; DREB=DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN, EAR= ETHYLENE RESPONSE FACTOR-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION), der in der *3xbhlh* Mutante bei -Fe eine signifikant schwächere Expression als im WT zeigt und in der Mutante durch SA induziert wird (Abb. 19, Gruppe II). Über DEAR5 ist bisher zwar wenig bekannt, das Protein besitzt allerdings 42,9 % Sequenzidentität zu DEAR1 einem weiteren Vertreter dieser Transkriptionsfaktorunterfamilie (Tsutsui et al., 2009), so dass ähnliche Funktionen möglicherweise auch für DEAR5 vermutet werden können. DEAR5 wird wie auch *DEAR1* in *Arabidopsis thaliana* unter Befall mit dem bakteriellen Blattpathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 verstärkt exprimiert (Tsutsui et al., 2009). DEAR1 scheint an der Regulation des Knotenpunkts zwischen biotischen

und abiotischen Stressantworten beteiligt (Tsutsui et al., 2009). DEAR1 wird nicht nur unter Pathogenbefall sondern auch unter Kältestress exprimiert und in Überexpressionslinien findet eine SA Akkumulation und eine konstitutive Expression der Abwehrgene *PR1*, *PR2* und *PR3* statt (Tsutsui et al., 2009). Nimmt man hypothetisch ähnliche Funktionen für DEAR5 an könnte seine signifikant reduzierte Expression und die von *PR1* und *PR5* in der *3xbhlh* Mutante möglicherweise auf das Fehlen der bHLHs zur Induktion der Transkription von DEAR5 oder dessen Aktivatoren bei -Fe zurückzuführen sein.

Eine Verknüpfung der Regulation von Eisenhomöostase- und Pathogenabwehrgenen ist für Pflanzen sinnvoll, da Eisen auch für die Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen sowohl ein limitierender Faktor ist, als auch toxische Wirkung besitzt und es daher für Pflanzen zur Abwehr von Pathogenen sinnvoll sein kann Eisen umzuverteilen. Monokotyledonen, die durch pathogene Pilze befallen werden, transportieren Eisen beispielsweise in den Apoplasten um intra- und extrazelluläre Abwehrmechanismen in Gang zu setzen (Liu et al., 2007). Das stark reaktive Eisen(III) führt in unchelatierter Form im Apoplasten zur Bildung von H₂O₂, während in der Zelle durch den nun herrschenden Eisenmangel Abwehrgene transkribiert werden. Durch die Eisenneuverteilung werden so auf zwei Ebenen Abwehrmechanismen in Gang gesetzt. Fasst man die Ergebnisse zusammen könnte die Rolle der bHLHs sowohl in der Seneszenz, als auch in der Pathogenabwehr in der Reorganisation des Eisenpools liegen, der in beiden Fällen starken Umstrukturierungen unterworfen ist und aufgrund der hohen Reaktivität des Elements einer starken Regulation bedarf. Dass bHLH Transkriptionsfaktoren Funktionen in der Regulation der Eisenmobilisierung von *Arabidopsis thaliana* besitzen ist seit der Erforschung von POPEYE (PYE) bekannt. Interessanterweise ist PYE mit *BHLH39* und *BHLH101* koreguliert (Long et al., 2010). Die korrespondierende Mutante (*pye-1*) hat zudem große Ähnlichkeit zur *3xbhlh* Mutante, die ebenfalls nur dann eine stärkere Chlorose als der WT zeigt, wenn der Eisenmangel mindestens 7 Tage anhält (Long et al., 2010). Zudem ist die Expression von *BHLH39* und *BHLH101* in der *pye-1* Mutante, unabhängig von der Eisenversorgung, signifikant induziert (Long et al., 2010). Das könnte darauf hindeuten, dass *PYE*, *BHLH39* und *BHLH101* negativ reguliert. Ein solcher Mechanismus könnte zusammen mit dem antagonistisch wirkenden BTS die Eisenmobilisierung durch *BHLH39* und *BHLH101* regulieren. Da bHLH Transkriptionsfaktoren durch ihre Fähigkeit zur Dimerisierung mit verschiedenen Bindungspartnern unterschiedliche

Zielgene ansteuern können wäre es möglich, dass die Ib(2) bHLHs zusammen mit *PYE* und *BTS* in Eisentransport und Mobilisierung eine Rolle spielen.

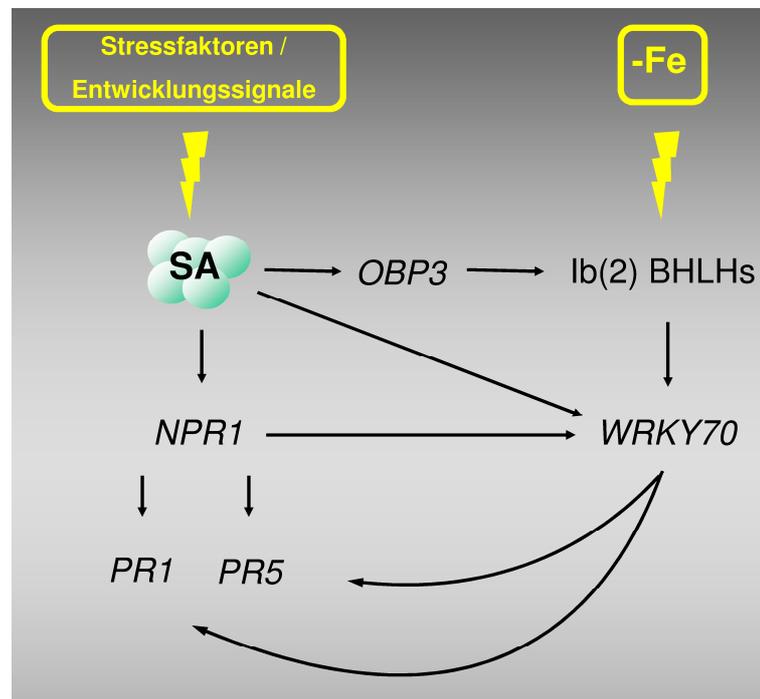


Abb. 38: Modell zur Regulation von Genen der altersvermittelten Seneszenz und Pathogenabwehr durch SA und die Ib(2) bHLHs

Stressfaktoren und Entwicklungssignale führen zur Aktivierung von Seneszenzgenen durch die Phytohormone ET, SA und JA. Durch SA werden die seneszenzassoziierten Gene *WRKY70*, *PR1* sowie das Abwehrgen *PR5* induziert. *WRKY70* ist sowohl *NPR1* als auch SA abhängig, während *PR1* und *PR5* von *NPR1* und *WRKY70* abhängig zu sein scheinen. Durch SA kann ebenfalls *OBP3* aktiviert werden, das ein positiver Regulator von *BHLH38* und *BHLH39* ist. Alle vier Ib(2) bHLHs sind eisenmangelinduzierbar und scheinen unter Eisenmangel *WRKY70* zu induzieren.

7.5 Das Transkriptom der *3xbhlh* Mutante zeigt die größte Anzahl differentiell regulierter Gene bei Eisenmangel

Der Vergleich der in der Mutante differentiell regulierten Gene, die einerseits durch SA oder durch -Fe oder beide Reize beeinflusst werden, zeigt mit 12% zu 74% aller Gene des Vergleichs ein deutliches Übergewicht für die durch Eisenmangel regulierten Gene gegenüber den SA regulierten Genen (Abb. 21 A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Transkriptom von WT und *3xbhlh* Mutante unter -Fe +SA Behandlung wesentlich geringere Unterschiede aufweist, als bei Eisenmangel alleine. Zieht man nun noch in Betracht, dass 14% dieser Gene durch beide Reize beeinflusst werden, ist ersichtlich, dass die bHLHs in beiden Netzwerken aktiv sind, bei Eisenmangel alleine aber mehr Gene von der Regulation der Transkriptionsfaktoren abhängig zu sein scheinen.

Die Gene der Schnittmenge zeigen zwei klar umrissene Gruppen, die sich nicht überschneiden: Die Gene die bei -Fe in der Mutante schwächer exprimiert sind als im WT (graugrün markiert) zeigen auch bei -Fe +SA in der Mutante eine schwächere Expression als im WT (rot markiert), während alle Gene die bei -Fe in der Mutante stärker exprimiert sind als im WT (pink markiert) auch bei -Fe +SA in der Mutante eine stärkere Expression als im WT (grau markiert) zeigen (Abb. 21 C). Das lässt darauf schließen, dass die Deregulation dieser 20 Gene auf das Fehlen der bHLHs zurückgeht, ohne dass die SA Behandlung Einfluss darauf nimmt.

Die sowohl bei -Fe als auch bei -Fe +SA in der Mutante hochregulierte Gruppe umfasst 8 Gene (pink markiert). Für die vier Gene AT5G53230, AT3G28570, AT5G52940 und AT2G03230 ist die Funktion bisher nicht bekannt. AT3G56700 kodiert für FAR6 (FATTY ACYL-COA REDUCTASE6) ein Enzym das die Bildung von Fettalkoholen in Chloroplasten katalysiert (Doan et al., 2011) und auch durch mechanische Verwundung der Pflanze aktiviert wird (Gupta et al., 2011). AT1G32900 kodiert für eine UDP-Glykosyltransferase, die für den Amyloseanteil der Stärke verantwortlich ist (Lohmeier-Vogel et al., 2008). AT2G41280 kodiert für ein LEA ähnliches Protein von dem man annimmt, dass es Trockentoleranz vermittelt (Raynal et al., 1999). Das letzte Gen der Gruppe, die in der Mutante stärker exprimiert werden als im WT ist AT2G41250. Es handelt sich um eine mitochondrielle Halosäure-Dehalogenase-ähnliche Hydrolase (HAD) die Dephosphorylierungen katalysiert. Interessant ist das dieses Gen mit einem

Diskussion

Abstand von 1339 bp auf Chromosom 2 direkt neben *BHLH100* (AT2G41250) liegt. Verschiedene Möglichkeiten sind denkbar die diesen Umstand erklären: Zum einen wäre es möglich, dass die bHLHs im WT dieses Gen reprimieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die T-DNA Insertion des *BHLH100* in der *3xbhlh* Mutante die Transkriptionshäufigkeit des Gens mitbeeinflusst.

Die Gruppe der Analyse, die bei –Fe in der Mutante schwächer exprimiert ist als im WT und bei –Fe +SA im WT im Vergleich zur Mutante ebenfalls stärker exprimiert wird, enthält unter anderem die Gene *COBL6*, *CYP82C4*, *BHLH39* und At3g21460, das für ein Glutaredoxin kodiert und AT1G52120, das für ein mannosebindendes Lektine (MBL) kodiert. *COBL6* und *CYP82C4* werden mit der Eisenhomöostase in Verbindung gebracht und beeinflussen sie wahrscheinlich positiv (siehe auch 7.2). Die *COBL6* und *CYP82C4* Expression könnte wie beschrieben bei Eisenmangel von einem Heterokomplexe aus FIT und den bHLHs positiv transkriptionell reguliert werden und ist daher in der Mutante bei –Fe schwächer als im WT. Die stärkere Expression dieser beiden Gene bei –Fe +SA im WT im Vergleich zur Mutante ist daher wohl ebenfalls auf das Fehlen der bHLHs zurückzuführen und wird auch durch die SA Behandlung nicht beeinflusst. Die Ib(2) bHLHs regulieren also wahrscheinlich gemeinsam mit FIT bei Eisenmangel die *COBL6* und *CYP82C4* Expression und das Phytohormon SA hat auf die Regulation keinen Einfluss. Die Anwesenheit von *BHLH39* in dieser Schnittmenge bestätigt das Ausschalten des Gens in der Mutante, das unabhängig von der SA Behandlung inaktiviert ist. Warum *BHLH100* bei dieser Messung im WT schwach exprimiert war und dadurch nicht in die Liste der bei –Fe +SA differentiell regulierten Gene gelangt ist, ist nicht vollständig klar. Bei Genexpressionsstudien mittels qRT-PCR unter –Fe +SA Bedingungen im Vorfeld war *BHLH100* im WT immer stärker exprimiert als in der *3xbhlh* Mutante (Daten nicht dargestellt).

SA verändert nicht die Vorzeichen der Deregulation der beiden Gene At3g21460 und AT1G52120. Allgemein sind mannosebindende Lektine wie AT1G52120 wichtig für die Signalgenerierung bei einem Pathogenangriff, da sie spezielle Kohlenhydratmuster auf der Pathogenoberfläche erkennen (I. S. Hwang und Hwang, 2011). Das Stilllegen des mannosebindenden Lektins CaMBL1 in Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) führt zu erhöhter Anfälligkeit gegen Pathogene und niedrigerer Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies im Gewebe, sowie geringerer SA Akkumulation und Expression SA-abhängiger Gene (I. S. Hwang und Hwang, 2011). Die signifikant schwächere Expression in der Mutante unter beiden Bedingungen könnte auch in Arabidopsis die

niedrigeren Genexpressionswerte von Pathogenabwehrkomponenten hervorrufen. Solche waren mit *WRKY70*, *PR1* und *PR5* bereits als differentiell regulierte Gene in der Mutante identifiziert worden und zeigen auch einen Zusammenhang mit der Blattseneszenz (siehe 7.4). Das unter beiden Bedingungen in der Mutante schwächer exprimierte At3g21460 kodiert für ein Glutaredoxin, die sowohl als Antioxidantien dienen (Rouhier et al., 2006), aber auch Eisen-Schwefel-Komplexe binden und zu entsprechenden Enzymen transportieren können (Rouhier et al., 2008). Das heißt für dieses Gen besteht aufgrund der Eisen-Schwefel-Komplexe theoretisch eine Verbindung zur Eisenhomöostase, allerdings sind speziell für dieses Glutaredoxin keine genauen Funktionen bekannt.

Diese Analyse zeigt, dass die hier besprochenen Gene regulatorisch unterhalb der bHLHs angesiedelt sind und auch durch SA Behandlung anscheinend keine anderen Regulatoren aktiv werden, die die Transkription dieser Gene in der *3xbhlh* grundlegend verändert. Offensichtlich handelt es sich um Zielgene im bHLH Ib(2) Netzwerk, die direkt abhängig von der Regulation dieser Transkriptionsfaktoren sind. Eine solche Regulation ist für die Gene *COBL6*, *CYP82C4* und das Glutaredoxin At3g21460 aufgrund ihrer vermuteten Rolle in der Eisenhomöostase denkbar. Ebenso ist die Regulation des mannosebindende Lektins AT1G52120 durch die bHLHs aufgrund der bereits aufgezeigten Verbindung zwischen der Eisenhomöostase und dem Abwehr- bzw. Seneszenznetzwerk wahrscheinlich.

7.6 Regulation der Gruppen I – IV durch SA und die vier bHLHs der Untergruppe Ib(2)

Der Vergleich der Vennanalysen (Abb. 20) der durch SA unter Eisenmangel induzierbaren Gene in WT ($WT -Fe \text{ gg } 3xbhlh -Fe \cap WT -Fe \text{ gg } WT -Fe +SA$, siehe Abb. 18) und *3xbhlh* Mutante ($WT -Fe \text{ gg } 3xbhlh -Fe \cap 3xbhlh -Fe \text{ gg } 3xbhlh -Fe +SA$, siehe Abb. 19) ermöglicht die Aufstellung eines Modells zur Regulation der differentiell regulierten Gene in den Gruppen I-IV durch SA und die bHLHs im WT (). Außerdem lassen die Gene, die nicht in dieser Schnittmenge, sondern nur in der *3xbhlh* Analyse vorhanden sind, Rückschlüsse auf weitere Funktion der bHLH Transkriptionsfaktoren zu, da diese Gene bei $-Fe$ im WT anders reguliert sind als in der Mutante und nur in der *3xbhlh* Mutante nicht aber im WT durch SA reguliert werden.

Betrachtet man nun die einzelnen Gruppen der *3xbhlh* und WT Analyse scheinen Gruppe I und III durch bHLHs und SA gegensätzlich reguliert zu werden. Die Gene der Gruppe I scheinen durch SA reprimiert zu werden, während die bHLHs möglicherweise positiv auf deren Transkription wirken, da die Expression in der *3xbhlh* Mutante bei –Fe schwächer ist als im WT (graugrün markiert). Die Gene der Gruppe III scheinen eher durch die bHLHs reprimiert zu werden, da ihre Expression in der Mutante bei –Fe im Vergleich zum WT zunimmt, während SA positiv auf die Genexpression wirkt. Gruppe II scheint von SA und den bHLHs induziert zu werden, da die Expression in der Mutante bei –Fe herunter reguliert ist und bei +SA im WT eine verstärkte Expression stattfindet. Die Gene der Gruppe IV werden wahrscheinlich von SA und den bHLHs reprimiert, da in der Mutante eine verstärkte Expression dieser Gene bei –Fe gemessen wurde und im WT eine Induktion bei Behandlung mit SA stattfindet. Die bHLH Transkriptionsfaktoren selbst werden durch Eisenmangel induziert (Wang et al., 2007; Vorwieger et al., 2007) während der SA Signalweg durch abiotische und biotische Stressfaktoren angeschaltet wird (Miura und Ohta, 2010; Larkindale und Knight, 2002; Larkindale et al., 2005; Gunes et al., 2007; Dong, 1998; Leon-Reyes et al., 2010; Spoel et al., 2003; Pieterse, Leon-Reyes, Van der Ent und Van Wees, 2009).

Die Gene des Venn Diagramms für die *3xbhlh* Mutante ($3xbhlh$ –Fe gg WT –Fe \cap $3xbhlh$ –Fe gg $3xbhlh$ –Fe +SA, siehe Abb. 19), die nicht in der WT Analyse (Abb. 18) vorhanden sind repräsentieren Gene, die nur in der Mutante SA-abhängig reguliert werden. Aufgrund der zum WT unterschiedlichen Regulation werden diese Gene teilweise anders reguliert als die im WT Modell () dargestellten Gruppen. Daher können diese Expressionsmuster sehr wahrscheinlich auf das Fehlen der bHLHs zurückgeführt werden. Diese Gene sind in Abb. 19 schwarz beschriftet und werden hier detailliert diskutiert. Die Gruppen I und III enthalten nur bereits in der WT Analyse (Abb. 18) vorhandene Gene. Nur die Gruppen II und IV enthalten Gene, die nicht bereits in der WT Analyse vorhanden waren.

Die Gruppe schwarz markierter, *3xbhlh* spezifischer Gene aus II enthält die beiden Gene AV562266 und AT1G28190 mit unbekannter Funktion, sowohl wie den bereits diskutierten Transkriptionsfaktor DEAR5 (AT4G06746).

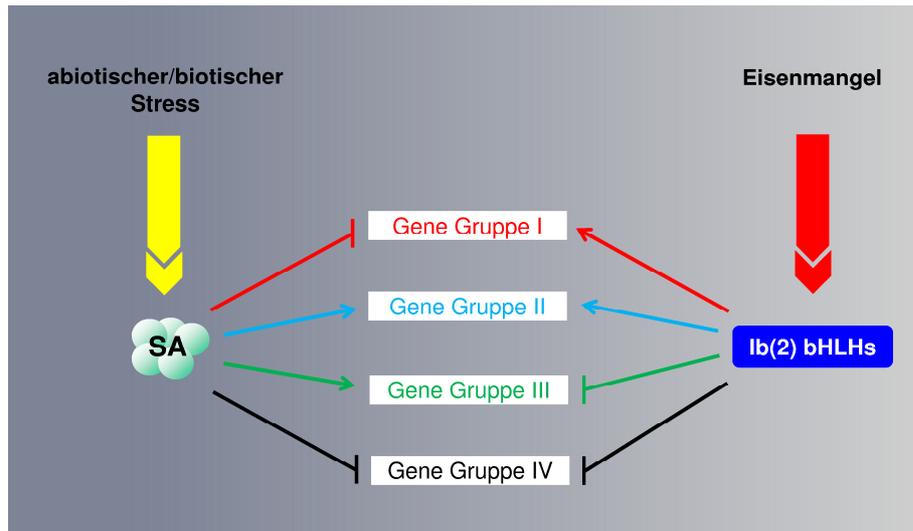


Abb. 39: Modell zur Regulation der Gene aus Venn-Diagrammgruppen durch SA und die Ib(2) bHLHs im WT

Das Modell zeigt die wildtypische Regulation der in den beiden Venn Analysen WT -Fe gg *3xbhlh* -Fe \cap WT -Fe gg WT -Fe +SA und WT -Fe gg *3xbhlh* -Fe \cap *3xbhlh* -Fe gg *3xbhlh* -Fe +SA gleichzeitig vorhandenen Genen, eingeteilt in die Gruppen I-IV. Die Gene der Gruppen I und IV werden bei SA induzierenden Stressreaktionen durch SA im WT reprimiert, die Gruppen II und III werden aktiviert. Die Gene der Gruppen III und IV werden bei Eisenmangel durch die Ib(2) bHLHs im WT reprimiert, die Gruppen I und II werden aktiviert.

Die Gruppe schwarz markierter, *3xbhlh* spezifischer Gene aus IV umfasst 14 Gene, im Folgenden wird nur auf diejenigen Gene eingegangen, für deren Funktion zumindest Hinweise bestehen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bHLHs oder Zielgene unterhalb der bHLHs für diese Gruppe bei -Fe als negative Regulatoren dienen ebenso wie SA bei Eisenmangel negativ auf die Genexpression der Gruppe IV Gene in der *3xbhlh* Mutante wirkt.

Das erste Gen der Gruppe IV *AT2G46800* kodiert für den vakuolären Zink²⁺/H⁺ Antiporter METAL TOLERANCE PROTEIN 1 (MTP1) der CDF (Cation Diffusion Facilitator) Familie. Der Transporter ist in sich teilenden und expandierenden Zellen lokalisiert und wird dort konstitutiv exprimiert. MTP1 transportiert Zn in Vakuolen und vermittelt Zn Toleranz (Kobae et al., 2004; Desbrosses-Fonrouge et al., 2005). Da die Homöostase von Metallionen wie Zn und Fe sich gegenseitig beeinflussen, ist eine verstärkte Expression des Zn Transporters MTP1 bei -Fe in der *3xbhlh* Mutante auch zur Untersuchung der Eisenhomöostase interessant. Zum einen kann Zn bei Eisenmangel vermehrt in die Pflanze aufgenommen werden, wenn es verfügbar ist, da IRT1 zwar durch die Eisenverfügbarkeit reguliert wird, aber auch andere zweiwertige

Diskussion

Metallkationen wie Zn^{2+} transportieren kann (Korshunova et al., 1999). Außerdem ist Zn wie auch Fe ein essentielles Element, das in zu hohen Konzentrationen toxisch wirken kann, daher sind auch hier Proteine zur Biosynthese von Metallchelatoren wie die Nikotianaminsynthasen (NAS) und Transporter für Metallchelatkomplexe wie der MATE Transporter FRD3 zur Aufrechterhaltung der Homöostase notwendig (Assunção, Schat, & Aarts, 2010). Die erhöhten Transkriptzahlen des Zn Transporters MTP1 bei –Fe in der *3xbhlh* Mutante deuten wahrscheinlich nicht auf eine erhöhte Zn Aufnahme in die Pflanze hin, da MTP1 konstitutiv unabhängig vom Zn Level exprimiert wird (Kobae et al., 2004; Desbrosses-Fonrouge et al., 2005). Vielmehr könnten gemeinsame Regulatoren der Fe und Zn Homöostase durch das Fehlen der bHLHs gestört sein. Dass Regulatoren existieren, die mit beiden Homöostasen vernetzt sind ist möglich, da auch der Import in die Wurzel durch Transporter wie IRT1 nicht streng selektiv stattfindet (Korshunova et al., 1999).

Das nächste Gen *AT2G01520* kodiert für ein cis-zimtsäureabhängiges Gen das zur Klasse der MLP (Major Latex Protein Like) Proteine gehört. Man vermutet, dass das Gen eine Rolle in der Verzögerung der Blütezeit und im vegetativen Wachstum spielt (D. Guo et al., 2011).

Das Gen *AT1G02820* (Abb. 19) kodiert für ein Protein der LEA3 (Late Embryogenesis Abundant) Familie. LEA Proteine reagieren auf abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Hitze, Salz, osmotischer Stress, Trockenheit und oxidativer Stress (Mowla et al., 2006). Das Gen *LEA3* wird in der Mutante bei –Fe im Vergleich zum WT hochreguliert und ist aber in der Mutante bei –Fe +SA im Vergleich zu –Fe Bedingungen wieder schwächer exprimiert. Eine Hypothese wäre, dass über das LEA Protein durch Fehlen einer negativen Regulation durch die Ib(2) Transkriptionsfaktoren oder deren Zielgene eine Stressantwort generiert wird, die die Transkription bei –Fe induziert. Eine solche Induktion kann scheinbar unter Salizylsäureeinfluss nicht ablaufen. Als Repressoren im SA Weg agieren z.B. Proteine der NIMIN (NIM1-INTERACTING1), TGA und WRKY Familien (Lu, 2009). Da z.B. für *WRKY70* die Mikroarrayergebnisse in dieser Arbeit auf eine Deregulation in der *3xbhlh* Mutante bei –Fe, allerdings nicht bei –Fe +SA hinweisen, wäre dieses Gen als Mitglied der WRKY Familie ein möglicher Regulator solcher Zielgene, der in der Mutante bei –Fe tatsächlich anders exprimiert wird und damit auch bei –Fe die Transkription von Genen wie *LEA3* beeinflussen könnte.

Über die nächsten beiden Gene, die von ihrer Sequenz sehr ähnlichen S-Adenosylmethionin-abhängigen-Methyltransferasen *At5g37970* und *At5g37990*, ist

bisher wenig bekannt. Allgemein synthetisieren S-Adenosylmethionin-abhängige-Methyltransferasen beispielsweise Methylsalizylat durch den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin zur Carboxygruppe des Salizylats. In vielen Publikationen wird berichtet, dass Methylsalizylat als flüchtiger Stoff als Antwort auf diverse biotische und abiotische Stresssituationen über die Blätter emittiert wird und beispielsweise dazu dient in benachbarten Pflanzen SA-abhängige Abwehrreaktionen zu induzieren oder potentielle Bestäuber anzulocken (Chen et al., 2003). Die erhöhte Expression beider Gene in der Mutante könnte als Antwort auf den Eisenmangel oder andere damit zusammenhängende Stressfaktoren zustandekommen und im WT durch die bHLHs speziell in Blättern reprimiert werden. Da aber die Funktion dieser Adenosylmethionin-abhängigen-Methyltransferasen nicht bekannt ist, kann darüber nur spekuliert werden.

Über die Funktion der Gene *At1g55960* und *At1g77100* gibt es bisher kaum Erkenntnisse, *At1g55960* ist vermutlich stressinduzierbar, wird in der Lipocalinmutante *Attil* herunter reguliert (Charron et al., 2008b) und könnte daher mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, da Lipocaline im Thylakoidlumen gegen reaktive Sauerstoffspezies wirken (Levesque-Tremblay et al., 2009). *At1g77100* kodiert für ein Protein der Peroxidasefamilie, die als Antioxidantien wirken, genaue Funktionen sind allerdings nicht bekannt (Guo et al., 2012). Auch die beiden Gene *At5g38000* und *At5g37940* reagieren auf oxidativen Stress und gehören zur Familie der zinkbindenden Dehydrogenasen, auch hier fehlen weitere Hinweise (Babiychuk et al., 1995).

Das Gen *At3g02380* kodiert für *COL2* (CONSTANS LIKE2) ein Homolog des Regulators des Blütezeitpunkts CONSTANS (CO). CO ist ein Zinkfingerprotein mit Transkriptionsfaktoraktivität (Ruckle et al., 2012; Khanna et al., 2009), das vermutlich von der inneren Uhr der Pflanze beeinflusst wird und dadurch eine Verbindung zwischen innerer Uhr und Regulation der Blütephase herstellt (Ruckle et al., 2012). *COL2* hat vermutlich ähnliche Funktionen wie CO. Für *COL2* konnte eine Koexpression mit dem nächsten Gen der Schnittmenge *CGA1* (*CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR 1*) gezeigt werden (Manfield et al., 2007). *CGA1* ist ein zirkadian reguliertes Mitglied der GATA Zinkfingertranskriptionsfaktoren (Manfield et al., 2007) und moduliert seinerseits die Expression von Genen der Chlorophyllbiosynthese (Hudson et al., 2011). Die in der *3xbhlh* Mutante differentiell exprimierten Gene im Zusammenhang der inneren Uhr werden in Abschnitt 7.7 diskutiert.

Diskussion

Die Gene der Gruppe II, die nur in der *3xbhlh* Analyse vorkommen, werden wahrscheinlich im WT bei -Fe über die bHLHs induziert, in der Mutante findet allerdings nur eine Induktion unter -Fe +SA statt. Diese Induktion kann scheinbar nicht ablaufen, wenn, wie im WT, alle bHLHs intakt sind. Das heißt diese Gene werden möglicherweise in der Mutante durch einen salizylsäureabhängigen Transkriptionsaktivator beeinflusst, der im WT bei -Fe +SA durch die bHLHs reprimiert wird. Eine solche Regulation verleiht für diese 3 Gene dem -Fe Signal Vorrang vor dem SA Signal und würde dazu führen dass bei +Fe über Salizylat möglicherweise ebenfalls eine Aktivierung dieser drei Gene möglich ist. Vielleicht ist diese Regulation auch vom Wechselspiel weiterer Phytohormone abhängig, ähnlich wie bei der SA-JA-ET abhängigen Regulation bestimmter Pathogenabwehrreaktionen (Koornneef und Pieterse, 2008; Spoel und Dong, 2008; Leon-Reyes et al., 2009). Physiologisch können solche Netzwerke ein anpassungsfähiges System schaffen, dass die Pflanze befähigt effizient auf wechselnde Bedingungen zu reagieren. Wie genau diese Prozesse ablaufen kann allerdings aufgrund der unklaren Genfunktionen noch nicht beantwortet werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bHLHs oder Zielgene unterhalb der bHLHs im WT für die Gruppe IV bei -Fe als negative Regulatoren dienen, ebenso wie SA in der *3xbhlh* negativ auf die Genexpression der Gruppe IV Gene wirkt. Dass viele der Gene, wie *AT1G02820*, *At1g55960*, *At1g77100*, *At5g38000* und *At5g37940*, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, bei Eisenmangel über die bHLHs reprimiert werden erscheint sinnvoll, da zumindest die Verhinderung von Eisen induzierten oxidativen Schäden bei Eisenmangel zweitrangig ist. Auch über SA findet eine Repression der Gruppe IV Gene statt, die entweder im WT aufgrund der ohnehin vorhandenen Repression durch die bHLHs nicht messbar ist oder nur in der Mutante vorliegt, da die Ib(2) bHLHs auch den Signalweg über SA zu diesen Genen reprimieren und aufgrund ihrer Abwesenheit in der Mutante daher bei +SA eine Repression der Gruppe IV Gene möglich ist. Unabhängig davon welche Regulation tatsächlich abläuft, für die Pflanze könnte sie dazu dienen z.B. bei Befall mit Pathogenen, die die SA Akkumulation auslösen, die Anwesenheit von Antioxidantien zu unterdrücken, die für die hypersensitive Zelltodantwort hinderlich sind. Auch für die nicht mit oxidativem Stress verbundenen Gene könnte es möglich sein, dass es für die Pflanze vorteilhaft ist deren Expression beim Eintreffen eines SA-vermittelten Stresssignals einzustellen, um diesen Stressreaktionen Vorrang zu geben. Ähnliches kann bei der JA vermittelten Induktion des Defensingens *PDF1.2* festgestellt werden. Sobald SA abhängige

Abwehrmechanismen aktiv werden unterdrücken sie die *PDF1.2* Expression und haben Vorrang (Koornneef und Pieterse, 2008; Spoel und Dong, 2008). Möglicherweise ist auch die Regulation der Eisenhomöostase in ein größeres Netzwerk von Stresshormonen eingebunden als bisher bekannt ist.

7.7 Mikroarrayanalyse gibt Hinweise auf differentielle Expression von Genen im Zusammenhang der inneren Uhr in der *3xbhlh* Mutante

In dieser Arbeit wurde in einer *BHLH39/100/101* Dreifachmutante mittels Mikroarray Transkriptomanalyse die signifikant induzierte Expression der Oszillatorgene der inneren Uhr *CCA1* und *LHY* bei Eisenmangel festgestellt (Abb. 18 Gruppe III). Allgemein dient die innere Uhr als Koordinator, um die Physiologie eines Organismus auf seine Umwelt anzupassen. Sie zeigt die Übergänge vom Tag zur Nacht an und ein Zyklus dauert 24 Stunden. Die innere Uhr regelt in Pflanzen z.B. Prozesse wie die Blattbewegungen, Stomataöffnung (Sanchez et al., 2011), Seneszenzverlauf und Blütephase (McWatters und Devlin, 2011). Eine mögliche Verbindung zwischen innerer Uhr und Eisenhomöostase wurde durch die Untersuchung des Gens *TIC* (*TIME FOR COFFEE*) von Duc et al. 2009 hergestellt. Das in der *3xbhlh* Mutante, signifikant schwächer exprimierte *TIC* (Abb. 18 Gruppe I) reprimiert im WT bei Eisenmangel Gene wie *FER1*, *FER3*, *FER4* und *APX1*, die bei genügender Eisenversorgung aktiv werden (Duc et al., 2009) und ist selbst im WT konstitutiv und wahrscheinlich unabhängig von der inneren Uhr exprimiert (Ding et al., 2007). Bei ausreichender Eisenversorgung endet die Repression durch einen unbekanntem Mechanismus und *FER1* zeigt rhythmische Expressionsmuster mit Expressionsmaxima jeweils 3 Stunden nach der Morgendämmerung (Duc et al., 2009). Allerdings ist nicht sicher ob es sich um eine übergeordnete Steuerung oxidativen Stresses über *FER1* handelt oder ob tatsächlich die Eisenhomöostase als solches reguliert wird (Haydon et al., 2011). Unabhängig von diesen offenen Fragen muss aber zumindest der Eisenstatus der Pflanze an *TIC* signalisiert werden um zu gewährleisten, dass die Repression von *FER1* nur bei Eisenmangel abläuft. Dazu müssen bisher unbekannte Gene mit *TIC* interagieren.

Diskussion

Möglicherweise stehen die Untergruppe Ib(2) bHLHs damit in Zusammenhang, wobei die Mikroarrayanalyse der *3xbhlh* keine Unterschiede in der *FER1* Expression zwischen WT und Mutante bei Eisenmangel zeigt, diese waren nur in qRT-PCR Experimenten gemessen worden (Abb. 8). Allerdings gibt es auch Hinweise, dass *TIC* nicht nur *FER1* beeinflusst, sondern auch Einfluss auf die innere Uhr nimmt und zu deren Reset beiträgt, da in *tic* Mutanten ähnlich wie in *elf3* Mutanten die innere Uhr nach 19 Stunden Dauerlicht stoppt (Sanchez et al., 2011). Da *TIC* selbst keine Domäne zur Lichtaufnahme besitzt ist es zumindest wahrscheinlich, dass das Protein als Signal unterhalb der Lichtaufnahme agiert (Sanchez et al., 2011). Das heißt *TIC* könnte selbst als Inputsignalgeber für den zentralen Oszillator fungieren. Der zentrale Oszillator ist einer von drei Hauptbestandteilen der inneren Uhr. Teil 1 sind die Rezeptoren zur Aufnahme von Umweltsignalen, die als Input für den zentralen Oszillator dienen, Teil 2 des Mechanismus ist der Oszillator selbst, der den Rhythmus generiert und Teil 3 sind die Outputsignale, die zu physiologischen Anpassungen führen (McWatters und Devlin, 2011). Als Inputsignal zum Einstellen der inneren Uhr werden Lichtsignale über Photorezeptoren, wie die Phytochrome für Rotlicht und die Cryptochrome für Blaulicht verwendet (Franklin, Larner und Whitelam, 2005; Millar, 2004) allerdings wird die innere Uhr z.B. auch von tageszeitabhängigen Temperaturschwankungen beeinflusst (McWatters und Devlin, 2011). Der zentrale Oszillator besteht aus *CCA1* und *LHY*, die an die Abendelemente (EE) in der Promotorregion von *TOC/PRR1 (TIMING OF CAB EXPRESSION/PSEUDORESPONSEREGULATOR)* binden und *TOC* im Tagesverlauf reprimieren, während ihre eigene Proteinkonzentration dann zum Abend hin abnimmt. Die in der *3xbhlh* signifikant erhöhte *CCA1* und *LHY* Expression könnte somit verschiedene Ursachen haben, möglich wäre z.B., dass Inputsignale durch die schwächere *TIC* Expression verändert an den zentralen Oszillator weitergeleitet werden und die Oszillationen der inneren Uhr aufgrund dessen nicht mehr mit der Tageszeit synchron verlaufen. Die Expression von *CCA1* und *LHY* könnte daher trotz gleicher Behandlung von *3xbhlh* und WT Pflanzen in beiden Linien eine unterschiedliche subjektive Zeit empfinden und zu anderen Zeiten Maxima erreichen. Geht man davon aus, dass es sich bei der veränderten Signalweiterleitung über *TIC* um Lichtsignale unterhalb der Cryptochrome und Phytochrome handelt, könnte damit möglicherweise auch die signifikante Induktion der Gene *HYH*, *COL1* (Abb. 18 Gruppe III), *CGA1* (Abb. 18 Gruppe IV) und *COL2* (Abb. 19 Gruppe IV) in der *3xbhlh* Mutante erklärt werden. Mikroarraydaten von Monte et al. aus dem Jahr 2004 weisen für *CGA1* auf eine *PIF3*-

abhängige Rotlichtinduktion hin. Zudem besitzen die Promotoren von *COL1*, *COL2* und *CCA1*, die mit *CGAI* koexprimiert werden, eine erhöhte Anzahl von G-Boxen (CACGTG), die sich in Promotoren lichtabhängig regulierter Gene wie *CCA1* und *LHY* befinden und von *PIF3* angesteuert werden (McWatters und Devlin, 2011). Möglicherweise dient *TIC* in der Weiterleitung der Lichtsignale als negativer Regulator von *CCA1/LHY* Inhibitoren, interessanterweise war ähnliches bereits für *ELF3* gezeigt worden, dessen KO Mutante *elf3* mit *tic* Mutanten Gemeinsamkeiten aufweist. Eine schwächere *TIC* Expression wie in der *3xbhlh* könnte dann zu einer *CCA1/LHY* Induktion führen. Ob *TIC* allerdings tatsächlich die Ursache für die Deregulation der zentralen Oszillatorgene in der Mutante ist oder ebenfalls nur ein Symptom anderer Defekte darstellt, ist mit dem derzeitigen Kenntnisstand nicht zu beantworten. Wie bereits erklärt besteht auch die Möglichkeit dass *TIC* seinerseits von der inneren Uhr reguliert wird oder sogar wechselseitige Beeinflussungen sind möglich. Auch die Kernfrage, wie das Fehlen der bHLHs in der Mutante mit der Deregulation des Oszillators und von ihm abhängiger Gene in Verbindung steht ist unklar. Da bisher keine Beispiele für die Beeinflussung der inneren Uhr durch Metallhomöostasen oder speziell die Eisenhomöostase bekannt sind, müssen Genexpressionsanalysen im Zeitverlauf an *3xbhlh* Mutanten und anderen Eisenhomöostasemutanten wie z.B. *fit* bei +/- Fe durchgeführt werden, um zu testen ob die Veränderungen im zentralen Oszillator der *3xbhlh* direkt mit dem Eisenhaushalt der Pflanze zusammenhängen. Möglicherweise beeinflussen auch Defekte in der Eisenhomöostase die Photosynthese negativ, so dass die Veränderungen in der inneren Uhr der *3xbhlh* über deren Produkte zu erklären sind, die nachweislich Einfluss auf den Oszillator haben (Bläsing et al., 2005; Dalchau et al., 2011). Diese Möglichkeit besteht, obwohl in der *3xbhlh* keine klassischen Eisenhomöostasegene dereguliert zu sein scheinen. Mögliche deregulierte Kandidatengene im Zusammenhang der Eisenhomöostase mit bisher unbekannt Funktionen wurden im Zuge des Mikroarrayexperiments gefunden und werden im Abschnitt 7.2 näher erläutert.

7.8 **BHLH39 ist ein positiver Regulator der Eisenaufnahme**

In dieser Arbeit wurde untersucht welchen Einfluss die Überexpression von *BHLH39* auf die Gene der Eisenaufnahme hat. Es konnte gezeigt werden, dass in den *BHLH39* Überexpressionslinien sowohl der Transkriptionsfaktor FIT, als auch Expression und Aktivität der Zielgene *FRO2* und *IRT1* induziert waren, während die anderen Mitglieder der Untergruppe Ib bei -Fe nicht länger induziert wurden. Im nächsten Schritt wurde bHLH39 auf Proteinlevel untersucht und die Ergebnisse zeigen, dass der bHLH Transkriptionsfaktor einer Abbaukontrolle bei Eisenmangelbedingungen unterliegt. Dabei kann man fast mit Sicherheit ausschließen, dass das Fusionsprotein als unfunktionell erkannt und abgebaut wird, da die erhöhte Expression und Aktivität der Zielgene die Funktionalität des HA-bHLH39 belegen. Schließlich wurden der Einfluss der Stresshormone Salizylat und Ethylen auf die posttranslationale Regulation von bHLH39 überprüft. SA konnte in Wurzeln unabhängig von der Eisenversorgung eine leichte Zunahme der bHLH39 Proteinmenge bewirken, während Ethylen wahrscheinlich keinen Effekt auf die posttranslationale Regulation des Proteins hat, da die Behandlung mit dem Ethylenvorläufer ACC und dem Ethylensyntheseinhibitor AVG keine Regulation des Proteinlevels erkennen ließen. bHLH39 ist ein positiver Regulator der Eisenmangelantwort, der bei Eisenmangel in Überexpressionslinien durch Proteinabbau kontrolliert wird, der aber möglicherweise über das Stresshormon Salizylat multifunktionale Stresssignale mit der Eisenmangelantwort verbindet.

Dass diese Funktionen von bHLH Transkriptionsfaktoren in Mono- wie Dikotyledonen konserviert zu sein scheinen, zeigen Untersuchungen an einem möglichen Ortholog von *BHLH39* namens *OsIRO2*. *OsIRO2* wurde ebenfalls als positiver Regulator der Eisenaufnahme in *Oryza sativa* beschrieben (Ogo et al., 2007). Bei Untersuchungen an *OsIRO2* Überexpressionslinien wurden trotz der Unterschiede in den Eisenaufnahmestrategien I und II ganz ähnliche Ergebnisse erhalten wie bei Überexpression von *BHLH39*. Es wurde gezeigt, dass ähnlich zur *FRO2* Induktion, die Gene zur Phytosiderophorsynthese verstärkt exprimiert wurden um Eisen aus dem Substrat zu lösen (Ogo et al., 2007). Außerdem wurde der Transporter des Eisens in die Wurzelepidermis *OsYS15* in Überexpressionslinien verstärkt exprimiert, ähnlich der *IRT1* Expression in 39ox Pflanzen (Ogo et al., 2007). Erkenntnisse aus dem *OsIRO2*

Netzwerk können dabei helfen die Funktionen der bHLH Ib(2) in der Eisenhomöostase von Arabidopsis weiter aufzuklären.

7.9 Die *BHLH39* Überexpression führt zu einer Akkumulation von Fe

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen in *BHLH39* Überexpressionslinien eine eisenunabhängige konstitutive *FRO2* und *IRT1* Expression, wobei *IRT1* sogar auf ein mehrfaches der WT Expressionswerte erhöht ist (Abb. 26) und FIT auch bei +Fe induziert wird. Diese konstitutive Expression der Eisenmangelgene führt schließlich zu einer stark erhöhten Eisenaufnahme bei +Fe und -Fe Bedingungen. Bei der Arbeit mit *BHLH39* Überexpressionspflanzen konnte die Gruppe um Yuan et al. (2008) dagegen für *FRO2* und *IRT1* bei -Fe Expressionswerte auf WT Niveau messen, während die Expression beider Gene bei +Fe zwar induziert, allerdings schwächer als bei -Fe war. FIT Expression konnte dort bei +Fe nicht festgestellt werden und die Eisenaufnahme war nur leicht erhöht. Dass Unterschiede in den hier verwendeten Überexpressionslinien zu denen von Yuan et al. (2008) bestehen, könnte seine Ursache in dem hier verwendeten doppelten 35s Promotor haben, während dort ein einfacher 35s Promotor zur Überexpression eingesetzt wurde. Wenn man davon ausgeht, dass bHLH39 keine Monomere bildet (Yuan et al., 2008) ist die stärkere Expression von *FRO2* und *IRT1* bei +Fe in der vorliegenden Arbeit vielleicht dadurch zu erklären, dass in den hier untersuchten Linien auch FIT Expression bei +Fe stattfindet (Abb. 26) und dann wahrscheinlich das FIT Protein zur Bildung eines aktiven Komplexes mit bHLH39 zur Verfügung steht, der *FRO2* und *IRT1* auch bei +Fe wie unter Eisenmangelbedingungen induzieren kann. Dass FIT überhaupt bei +Fe exprimiert wird, könnte darauf hindeuten, dass *BHLH39* FIT auf Transkriptionsebene positiv regulieren kann. Möglicherweise dient bHLH39 nicht nur als Heterokomplexparker sondern auch als Teil der Eisenmangelsignalkette und befindet sich innerhalb dieser Kette oberhalb von FIT. Wenn bHLH39 tatsächlich eine solche wichtige Rolle in der Weiterleitung des Eisenmangelsignals einnimmt, dann kann die unveränderte Eisenmangelantwort in *BHLH38* Mutanten (Wang et al., 2007) nur durch hohe Redundanz der Funktionen zumindest von *BHLH38/39* erklärt werden. Wenn bHLH39 tatsächlich FIT induzieren

kann, dann könnte eine hohe Expressionsrate von *BHLH39* und damit wahrscheinlich eine hohe Menge an aktivem Protein, starken Eisenmangel signalisieren, der *FIT*, unabhängig von der tatsächlichen Eisenversorgung induziert. Das ein Transkriptionsaktivator für *FIT* existieren könnte, der selbst durch Eisenmangel aktiviert wird, beschreiben auch die Autoren in Meiser et al., 2011 auf der Grundlage ihrer Genexpressionsstudien. Dort konnte in Übereinstimmung mit vorherigen Publikationen (Colangelo und Guerinot, 2004a; Jakoby et al., 2004; Yuan et al., 2005) gezeigt werden, dass die *FIT* Aktivierung auf Transkriptionsniveau beginnt, da *FIT* bei Eisenmangel verstärkt transkribiert wird. Ein solcher Aktivator könnte *BHLH39* sein. Als weitere Möglichkeit wurde von Meiser et al., 2011 ebenfalls diskutiert, ob ein Repressor bei +Fe die *FIT* Transkription unterbindet, da bei Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid unter +Fe eine verstärkte *FIT* Expression beobachtet werden konnte. Diese könnte laut Meiser et al., 2011 damit zusammenhängen, dass ein *FIT* Repressor bei +Fe dem Proteinabbau unterliegt und durch die Cycloheximidbehandlung diese Repression wegfällt. Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse mit der *BHLH39* Überexpressionslinie kann eine weitere Alternative in Betracht gezogen werden. Möglicherweise bindet bei +Fe Bedingungen tatsächlich ein abbauregulierter Repressor an den *FIT* Promotor, gleichzeitig dient aber auch *bHLH39* bei -Fe als Aktivator. In der 39ox Linie könnte *bHLH39* aufgrund der hohen Menge des Proteins den Repressor am *FIT* Promotor verdrängen und dadurch die *FIT* Expression aktivieren.

Betrachtet man nun die Regulation der Heterokomplexzielgene *FRO2* und *IRT1* in der 39ox Linie, zeigt sich, dass *IRT1* auf ein mehrfaches des WT Niveaus induziert wird, während *FRO2* etwa den Expressionslevel wie der WT bei Eisenmangel zeigt. Diese Beobachtung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass *bHLH39* noch eine weitere Funktion in der Regulation der *IRT1* Expression besitzt.

Die tatsächliche Aktivität von *FRO2* und *IRT1* gibt weitere interessante Anhaltspunkte über deren Regulation. Wenn man als Maß der *IRT1* Aktivität die hohe Eisenkonzentration in den Überexpressionspflanzen nimmt, ist es wahrscheinlich dass *IRT1* nicht nur stark transkribiert wird, sondern auch eine große Menge aktiven Proteins in Wurzeln der 39ox Pflanzen unabhängig von der Eisenversorgung vorliegt (Abb. 28). Dadurch werden hohe Mengen an Eisen und möglicherweise auch anderer zweiwertiger Metallkationen in die Pflanze aufgenommen, die toxische Effekte haben könnten, was den Phänotyp der Pflanzen erklären könnte. Bei Überexpression von *IRT1*, was ebenfalls eine drastische konstitutive Eisenaufnahme zur Folge hat, die ähnlich hohe

Diskussion

Eisenkonzentrationen in der Pflanze hervorruft wie in den hier beschriebenen Linien, wurde ebenfalls reduziertes Wurzelwachstum festgestellt (Barberon et al., 2011) und unterstützt damit die Vermutung, dass der Phänotyp auf den hohen Eisengehalt zurückgeht. Ebenfalls verkürztes Wurzelwachstum wurden bei der Überexpression des *AtbHLH39* in Tabakpflanzen beobachtet, allerdings wurden hier keine Metallgehalte untersucht, sondern gezeigt, dass die Überexpression zu einer starken Riboflavinabgabe über die Wurzeln ins Medium führte, die regulär nur bei Eisenmangel auftritt (Vorwieger et al., 2007). Obwohl Arabidopsis die Fähigkeit zur Riboflavinabgabe nicht besitzt, könnte *BHLH39* dennoch auch in Arabidopsis in einem weiteren stressabhängigen Signalweg eine Rolle spielen, der ähnliche Sekundärstoffe bildet und die Morphologie der Pflanze beeinflusst. Aufgrund der unklaren Rolle des Riboflavins in der Eisenaufnahme, besteht aber auch bei dieser Hypothese die Möglichkeit, dass die veränderte Morphologie ursächlich auf verstärkte Eisenaufnahme zurückgeht, die durch Sekundärstoffe hervorgerufen wird. Dass der Phänotyp durch umsetzen auf Erde reversibel ist könnte mit der Art des Eisenangebots zusammenhängen. Das Fe(II) im FeNaEDTA der Hoaglandplatten ist möglicherweise leichter zugänglich als das Fe(III)/Fe(II) Gemisch in der Erde und eine toxische Überversorgung mit morphologischen Veränderungen ist daher eher auf Hoaglandplatten erreicht. Bei der verstärkten Eisenaufnahme in die 39ox Pflanzen spielt auch die Reduktase *FRO2* eine wichtige Rolle. In 39ox Pflanzen ist *FRO2* wie beschrieben konstitutiv aktiv (Abb. 26). Dadurch führt *FRO2* im Zusammenspiel mit *IRT1* auch bei +Fe zu einer bedarfsunabhängigen Eisenaufnahme. Dabei ist die *FRO2* Aktivität interessanterweise bei +Fe auf die Wurzelhaarzone beschränkt, während bei -Fe Reduktaseaktivität entlang der gesamten Wurzel zu beobachten ist (Abb. 29). Das zeigt, dass die vermutete posttranskriptionelle Regulation von *FRO2*, die in *FRO2* Überexpressionslinien nur Reduktaseaktivität bei Eisenmangel zulässt bei Überexpression von *BHLH39* teilweise ausgeschaltet ist (Connolly et al., 2003). Das könnte bedeuten, dass eine negative posttranskriptionelle *FRO2* Regulation stattfindet, die ihrerseits vom bHLH39/FIT Komplex direkt oder indirekt inaktiviert wird. Allgemein kann eine Regulation nach der Transkription bei der Erstellung der 5'Kappe, des 3'-Poly-A-Schwanzes, beim Spleißen und dem Transport der mRNA ansetzen. Zur gezielten Repression eines Gens müssten Transkripte oder Proteine mit einer Affinität zur zu regulierenden mRNA vorhanden sein. Im Fall eines Proteins als Repressor könnte der Heterokomplex durch Protein-Protein Wechselwirkungen die Aktivität des Regulators unterbrechen. Wie genau diese

Prozesse im Fall der *BHLH39* Überexpression ablaufen ist auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse allerdings nicht klar.

Die Ergebnisse der Reduktaseaktivitätsmessung zeigen außerdem die veränderte Lokalisierung Aktivität, die in FITox Linien nie beobachtet werden konnte. Daher könnte es sein, dass der limitierende Faktor für die Heterokomplexaktivität möglicherweise bHLH38 oder bHLH39 ist und bei genügender Konzentration dieses Faktors gewebespezifische Expressionsmuster, die die Eisenaufnahme betreffen, verändert werden können. Insgesamt hat *BHLH39* positiven Einfluss auf die Expression und Aktivität der Eisenaufnahmegene *FRO2* und *IRT1* aber auch auf den Regulator *FIT*. Auf der Suche nach dem Ursprung des Eisenmangelsignals wurde daher die Regulation des *bHLH39* genauer untersucht.

7.10 Die *BHLH39* Aktivität wird auf mehreren Ebenen reguliert

Man nimmt an, dass Arabidopsispflanzen, die unter Eisenmangel leiden, die Gene des Eisenaufnahmeapparates durch FIT/bHLH38 bzw. bHLH39 Heterodimere induzieren (Yuan et al., 2008). *BHLH39* ist daher ein putativ wichtiger Faktor der Eisenhomöostase in *Arabidopsis thaliana*. In dieser Studie wurde daher die bHLH39 Regulation auf posttranslationaler Ebene untersucht und die Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation bestätigt und erweitert. Formen transkriptioneller Regulation wurden für die Gene der Untergruppe Ib(2) bereits durch die Induzierbarkeit der Expression bei Eisenmangel gezeigt (Vorwieger et al., 2007; Wang et al., 2007) und in dieser Arbeit bestätigt (Abb. 7 und Abb. 27), ähnliches gilt auch für die Induzierbarkeit von FIT bei -Fe. Die dafür verantwortlichen Regulatoren könnten entweder bei Eisenmangel aktive positive Regulatoren oder aber bei ausreichender Eisenversorgung aktive Repressoren sein, die Einfluss auf die Untergruppe Ib(2) und *FIT* nehmen. Um den Ursprung des Eisenmangelsignals zu finden, müssen diese Regulatoren in zukünftigen Studien untersucht werden. Um Hinweise über diese grundlegenden Mechanismen zu erhalten, muss zuerst die Regulation der Zielproteine untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Studie mit *BHLH39* Überexpressionslinien gearbeitet, um

Diskussion

Regulationsmechanismen unabhängig von transkriptioneller Kontrolle untersuchen zu können. Zusätzlich zur bereits bekannten Form der posttranskriptionellen Regulation konnte hier gezeigt werden, dass in der 39ox Linie bei –Fe keine zusätzliche Induktion von *BHLH39*, *FIT*, *FRO2* und *IRT1* als Antwort auf den Eisenmangel stattfindet. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beschriebenen Regulatoren zumindest für die *BHLH39* und *FIT* Transkription wahrscheinlich eher Repressoren sind, die bei ausreichender Eisenversorgung aktiv werden um die Transkription von *BHLH39* und *FIT* zu unterbinden. Durch die starke 2x35s getriebene *BHLH39* Expression in der 39ox Linie wird das Protein dann aber trotz des putativen Repressors gebildet und könnte möglicherweise bei Eisenmangel zur Induktion der *FIT* Expression beitragen. Unterstützt wird diese Theorie zumindest für *FIT* durch die kürzlich publizierte Beobachtung, dass im WT bei +Fe die *FIT* Transkription unter Cycloheximidbehandlung induziert wird, was darauf hindeutet das die Translation eines *FIT* Repressors durch die Behandlung inhibiert wird (Meiser et al., 2011).

Auf Proteinebene konnte durch Cycloheximidbehandlungen gezeigt werden, dass *bHLH39* bei Eisenmangelbedingungen in starkem Maß durch Proteindegradation kontrolliert wird (Abb. 30) und damit tatsächlich posttranslational reguliert wird. Da *bHLH39* in den unbehandelten Kontrollbedingungen bei +Fe und –Fe in etwa gleicher Menge vorhanden ist scheint die Translation nicht eisenabhängig reguliert zu sein und das Protein muss bei –Fe ständigem Abbau und Neusynthese unterworfen sein, um eine ähnliche Proteinmenge wie bei +Fe aufrecht zu erhalten. Da in WT Pflanzen die Transkription des *BHLH39* nur unter Eisenmangelbedingungen induziert wird, ist das *bHLH39* Protein bei +Fe wahrscheinlich nicht vorhanden; diese auf Expressionsdaten gestützte Hypothese (Wang et al., 2007; vergleiche auch Abb. 17) muss aber durch Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen natives *bHLH39* noch getestet werden. Der beständige Abbau und die andauernde Neusynthese bei Eisenmangel könnte aber wahrscheinlich auch im WT stattfinden. Der hohe Proteinumsatz bei -Fe dient mutmaßlich dazu, das bei Eisenmangel akkumulierende Protein schnell verändernden Eisenbedingungen anpassen zu können, um die Aufnahme toxischer Eisenmengen und anderer Metalle zu verhindern, die durch die aktive Eisenmangelantwort in die Pflanze transportiert werden können. Eine ähnliche Form der Abbauregulation war auch für *FIT* in zwei Studien gezeigt worden. Sivitz et al. (2011) erklären, dass Eisenmangel nicht nur zur Induktion der *FIT* Expression sondern auch zur Destabilisierung des Proteins führt, um „verbrauchtes“ *FIT* Protein von den Promotoren der Zielgene zu entfernen, während

Lingam et al. (2011) annehmen, dass sowohl „verbrauchtes“ FIT Protein und auch aktives gleichermaßen Ziel proteasomalen Abbaus sind. Unabhängig davon von welchem Modell man ausgeht, die Interaktionspartner FIT und bHLH39 werden beide wahrscheinlich durch Proteinabbau kontrolliert und ermöglichen damit eine noch genauere Regulation der Eisenaufnahme.

Als weitere Regulationsebene können Transkriptionsfaktoren allgemein durch Modifikationen wie z.B. Ubiquitinierung, Nitrosilierung und Phosphorylierung reguliert werden. Speziell für FIT wird angenommen, dass die zuvor beschriebene aktive bzw. inaktive Form durch kovalente Modifikation entsteht (Meiser et al., 2011). Auch hier könnten ähnliche Mechanismen für bHLH39 gelten, welches in allen durchgeführten Western Blot Experimenten mit langen SDS Gel Auftrennungszeiten statt 35,7 kDa immer spezifische Mehrfachbanden mit gleichen Proteingrößen von circa 39 kDa, 48 kDa, 57 kDa und 66 kDa aufwies, bei denen es sich um modifiziertes bHLH39 handeln könnte (Abb. 30 und Abb. 31). Eine mögliche Form der Modifikation wäre die Ubiquitinierung. Dabei wird das 8,5 kDa kleine Ubiquitin Protein (Ciechanover et al., 1978) kovalent mit seinem Zielprotein verbunden und reguliert entweder dessen Funktion oder führt es zur Degradation dem 26s Proteasom zu (Hershko und Ciechanover, 1998). Der Effekt der Modifikation ist abhängig von Struktur und Länge der Polyubiquitinierung. Der ubiquitingesteuerte proteasomale Abbau könnte den hohen Umsatz von bHLH39 bei -Fe erklären und ist eine Regulation die für andere bHLH Transkriptionsfaktoren wie z.B. PIF, das lichtabhängige Gene reguliert, bereits bewiesen wurde. Bei Lichteinfall werden PIF Proteine phosphoryliert und anschließend durch den 26s Proteasom abgebaut (Al-Sady et al., 2006; Shen et al., 2007). Die Phosphorylierung von bHLH39 wäre ebenfalls eine Modifikation, die die Mehrfachbanden erklären könnte. Welchen Effekt eine solche Phosphorylierung im Fall des bHLH39 hätte, darüber kann nur spekuliert werden. Wie bereits für PIF Proteine beschrieben, könnte die Phosphorylierung z.B. den Abbau begünstigen oder zur Deaktivierung führen, während allerdings auch verschiedenen Phosphorylierungsstellen eines Proteins jeweils unterschiedliche Effekte wie Aktivierung und Deaktivierung haben können (Lampard et al., 2008). Die aktuell vorliegenden Ergebnisse zeigen zumindest, dass *BHLH39* auf Transkriptniveau durch Eisenmangel induziert wird und liefern aussagekräftige Hinweise für posttranslationale Modifikationen und posttranslationale Abbaukontrolle bei -Fe, die wahrscheinlich über das bHLH39 Protein als limitierendem Faktor für die Heterokomplexaktivität die Eisenmangelantwort reguliert.

7.11 Salizylsäure trägt zur Feinabstimmung der bHLH39 Proteinmenge in geringem Maße bei, Ethylen dagegen nicht

Da Ethylen die Eisenmangelantwort möglicherweise über die FIT Proteinstabilität beeinflusst (Lingam et al., 2011) wurde in dieser Arbeit überprüft ob das auch für bHLH39 zutreffend ist. Auf Transkriptebene gab es bereits Studien die zeigen, dass bHLH38/39 bei Eisenmangel durch Ethyleninhibitoren reprimiert und durch Ethylen oder den Ethylenvorläufer ACC induziert werden können (García et al., 2010; Lucena et al., 2006). Proteindaten wurden bisher allerdings nicht veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit lag das bHLH39 Protein in der 39ox Linie unabhängig vom Eisenstatus in Wurzeln und Blättern vor. Unter Einfluss des Ethylenvorläufers ACC und des Ethylensyntheseinhibitors AVG waren unabhängig vom Eisenstatus keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass Ethylen bHLH39 nicht auf Proteinlevel reguliert. Eine Regulation der Eisenmangelantwort durch Ethylen läuft also auf Proteinlevel wahrscheinlich nur über den Heterokomplexpартner FIT ab. Man muss in Betracht ziehen, dass hier mit einer Überexpressionslinie gearbeitet wurde und durch die konstitutive Expression Effekte auf Transkriptebene weniger deutlich als im WT oder gar nicht sichtbar sind.

Da Untersuchungen mit dem Phytohormon Jasmonat in dieser Arbeit reprimierende Effekte auf die Eisenaufnahmegene gezeigt haben, wurden auch die Effekte des antagonistisch wirkenden Salizylats auf die Eisenaufnahmegene und in diesem Fall auch auf den positiven transkriptionellen Regulator der Eisenaufnahme, bHLH39, getestet. Im Wurzelgewebe konnte unabhängig von der Eisenversorgung eine schwache Erhöhung der 3xHA-bHLH39 Proteinmenge unter SA Einfluss festgestellt werden. Der insgesamt sehr dezent ausgeprägte Effekt der Salizylsäure in Wurzeln, bestätigt die Untersuchungen zu den Effekten des Salizylats auf die Eisenaufnahmegene, die gezeigt hatten, dass SA diese nicht induziert und damit nicht als Eisenmangelsignal dient. Physiologisch spielt SA für die Eisenaufnahme selbst also vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Der schwache Anstieg der *BHLH39* Transkripte und Proteinmenge bei Anwesenheit des Hormons kann in der Pflanze zur Regulation der Eisenmangelantwort höchstens zur Feinabstimmung dienen.

7.12 Jasmonsäure dient zur Feinabstimmung der Eisenmangelantwort

Die Gene der Eisenmangelantwort werden von internen Signalen reguliert. Als interne Signale dienen unter anderem systemische Signale, die die Eisenversorgung des Sprosses mit der Aufnahme in Wurzeln koordinieren. Hier wurde untersucht ob das systemisch agierende Pflanzenhormon Jasmonat (Shah et al., 2009) die Regulation der Eisenaufnahme beeinflussen kann und inwiefern Jasmonat als mögliches systemisches Signal zur Regulation der Eisenmangelantwort dient. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Phytohormon Jasmonat die Genexpression der Eisenaufnahmegene *FRO2* und *IRT1* negativ reguliert. Dabei war die Regulation unabhängig von dem bHLH Transkriptionsfaktor FIT, der ein zentraler Regulator der Eisenmangelantwort ist, obwohl auch die *FIT* Expression teilweise von JA reprimiert wurde. Es gibt allerdings erste Hinweise, dass die JA vermittelte Repression über die Regulation des bHLH39 auf Proteinebene abläuft. Insgesamt konnte JA nicht als das systemische Signal der ausreichenden Eisenversorgung identifiziert werden, es kann die Eisenmangelantwort aber teilweise reprimieren.

7.13 Jasmonat wirkt als negativer Regulator der Eisenaufnahme

Ausgehend von den folgenden Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass Jasmonat die Genexpression von *FRO2* und *IRT1* negativ beeinflusst: Es wurde gezeigt, dass die Behandlung von JA eine negative Regulation des *IRT1* Promotors und der Genexpressionslevel von *FRO2* und *IRT1* in Wurzeln hervorrief. Der Einsatz des Lipoxygenaseinhibitors Ibuprofen hingegen hatte eine verstärkte Genexpression von *FRO2* und *IRT1* zur Folge. Schließlich wurde bei Eisenmangel eine stärkere Genexpression von *FRO2* und *IRT1* in den Jasmonatmutanten *jar1-1* und *coi1-1* als im WT festgestellt. Fasst man diese drei Beobachtungen zusammen, kann man daraus schließen, dass Jasmonat als Inhibitor der Eisenmangelantwort funktioniert. Da FIT ein positiver Regulator der *FRO2* und *IRT1* Expression ist (Colangelo und Guerinot, 2004;

Diskussion

Jakoby et al., 2004), wäre eine weitere Erklärung, dass das *FIT* Gen selbst von Jasmonat reguliert wird. Allerdings zeigen die Ergebnisse an, dass das nur teilweise zutrifft, da zwar eine schwächere *FIT* Expression als Antwort auf JA zu beobachten war, aber keine veränderten Expressionswerte in Folge von Ibuprofenzugabe oder in der *jar1-1* Mutante festgestellt werden konnten. Das *FIT* Gen reagierte also nur auf das von außen zugeführte JA, nicht aber auf eine Veränderung des internen Jasmonatlevels durch Zugabe von Ibuprofen, wie es für *FRO2* und *IRT1* der Fall ist. Die unterschiedlichen Reaktionen von FIT auf internes oder externes Jasmonat könnten möglicherweise auf Konzentrationseffekte oder unterschiedliche Signalweiterleitung nach der Aufnahme des Jasmonats zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung für den schwächeren Effekt von JA auf *FIT* könnte sein, dass das interne Jasmonat auf posttranskriptionellem Level, das Vorhandensein und die Aktivität des FIT Proteins reguliert. In der Abwesenheit von FIT in der *fit* Mutante allerdings waren *FRO2* und *IRT1* unter Jasmonatzufuhr fast vollständig reprimiert, was unerwartet war, weil die Mutante sehr starken Eisenmangel verspürt und anzunehmen war, dass dabei die jasmonatabhängige Inhibition der Eisenmangelantwortgene umgangen wird. Dieses Ergebnis zeigt deutlich dass die jasmonatabhängige Inhibition von *FRO2* und *IRT1* nicht von FIT abhängig ist. Daher ist es wahrscheinlich das Jasmonat auf einen zusätzlichen Mechanismus bei -Fe wirkt der für die Induktion von *FRO2* und *IRT1* zuständig ist. Da der zweite Teil des Heterokomplexes zur Aktivierung von *FRO2* und *IRT1* durch bHLH38/39 repräsentiert wird, ist es möglich, dass die reprimierende Jasmonatwirkung über Repression dieser beiden Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Da der Reprimierende Effekt von JA auf Transkriptebene von *BHLH38* und *BHLH39* in unseren Versuchen (Daten nicht gezeigt) im Gegensatz zu Kang et al., 2003 nur schwach ausgefallen war, während die Zielgene *FRO2* und *IRT1* stark betroffen waren, wäre es daher möglich, dass JA die Transkriptionsfaktoren auch auf posttranskriptioneller Ebene beeinflusst. Um dieser Theorie nachzugehen wurden bereits erste Analysen mit *3xHA-BHLH39* Überexpressionslinien durchgeführt (Daten nicht veröffentlicht), die Hinweise darauf geben dass JA bei -Fe im Gegensatz zu +Fe negative Wirkung auf die 3xHA-bHLH39 Proteinmenge haben könnte, während der Effekt des Phytohormons auf Transkriptebene nicht signifikant ist. Das würde die Theorie unterstützen, dass die JA abhängige Repression von *FRO2* und *IRT1* über bHLH39 abläuft. Weitere Western Blot Analysen mit 3xHA-FIT Linien sind notwendig um zu zeigen, ob JA auf Proteinlevel auch auf FIT wirkt und ob bHLH39 tatsächlich betroffen ist. Um diesen hochinteressanten

Mechanismus näher zu untersuchen wären Kombinationsbehandlungen von JA mit Cycloheximid hilfreich, um zu testen ob unter JA Einfluss ein bHLH39 Proteinabbau stattfindet. Die Kultivierung einer *3xHA-bHLH38* Überexpressionslinie wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant und würde weitere Rückschlüsse auf die Redundanz der Gene nicht nur im Zusammenhang des JA Netzwerks zulassen.

7.14 Ibuprofen und die *coi1-1* Mutation unterbinden das systemische Eisensignal nicht

Man nimmt an, dass eine negative Regulation der Genexpression der Eisenmangelantwortgene vom ausreichend mit Eisen versorgten Spross ausgeht, um die Eisenaufnahme in Wurzeln, zu vermindern (Vert et al., 2003; Wang et al., 2007). Die chemische Natur des systemischen Signals, das die Eisenhomöostase reguliert, ist nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht ob Ibuprofen oder die *coi1-1* Mutation einem solchen Signal entgegenwirken können. Die Jasmonatbiosynthese in Pflanzen ist abhängig von Lipoxygenaseenzymen und das Produkt dieser Synthese ist ein mobiles Signal, das systemisch bei Verletzungsantworten wirkt. Die *coi1-1* Mutante ist jasmonatinsensitiv und damit unempfindlich gegenüber diesem Signal. Wenn Jasmonat als systemisches Signal ausreichender Eisenversorgung dienen würde, müsste hypothetisch betrachtet im Wurzeltrennungssystem unter Einfluss von Ibuprofen in der *coi1-1* Mutante die Expression von *FRO2* und *IRT1* in der -/ Wurzelhälfte genauso stark induziert sein wie in der -/- Probe. Tatsächlich führte die Zugabe von Ibuprofen zu einem generellen Anstieg der *FRO2* und *IRT1* Expression in allen Proben, allerdings blieb der Unterschied zwischen der -/ Wurzelhälfte und der -/- Probe bestehen. Damit wurde schließlich gezeigt, dass die Mutante WT ähnlich im Wurzeltrennungssystem reagiert und *FRO2* und *IRT1* in der -/ Wurzelhälfte reprimiert werden. Das bedeutet, das Signal ausreichender Eisenversorgung war sowohl unter Einfluss von Ibuprofen noch aktiv, als auch in der jasmonatinsensitiven Mutante in der -/ Wurzelhälfte im Wurzeltrennungssystem. Daraus lässt sich schließen, dass Jasmonat im Wurzeltrennungssystem in der -/ Wurzelhälfte nicht als das Signal ausreichender Eisenversorgung zur Inhibition von *FRO2* und *IRT1* dient.

7.15 Mögliche Funktionen der jasmonatvermittelten Inhibition der Eisenaufnahme

Da keine Hinweise darauf gefunden wurden, dass Jasmonat als systemische Signal dient, stellt sich die Frage, welche Funktion die Inhibition der Eisenaufnahme durch Jasmonat in Pflanzen hat. Die Zugehörigkeit von Jasmonat zu den Stresshormonen die eine vorrangige Rolle in Stress- und Abwehrsituationen spielen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei dieser Inhibition um eine spezifische Stressantwort handelt. Jasmonat vermittelt z.B. Toleranz gegenüber herbivoren Insekten und nekrotrophen Pathogenen (Baldwin, 1998; Beckers und Spoel, 2006; Glazebrook, 2005). Möglicherweise hilft die Reduzierung der Eisenaufnahme dabei in einer solchen Abwehrreaktion den Zelltod einzudämmen, da der Verlauf einer dann typischerweise auftretenden Nekrose eisenabhängige Enzyme benötigt. Interessanterweise können Ethylen und Stickstoffmonoxid die Eisenaufnahme in Pflanzen positiv beeinflussen (z.B. García et al., 2010), darüber hinaus wurde berichtet, dass beide Signale als potentielle Antagonisten der Jasmonatantwort agieren können (Adams und Turner, 2010; Orozco-Cárdenas und Ryan, 2002). Daher könnte die Eisenaufnahme unter Kontrolle eines komplexen Stresshormonnetzwerkes stehen. Die Verknüpfung der Eisenhomöostase mit dem komplexen Netzwerk der Jasmonsäure könnte dabei über Mitglieder der Ib(2) bHLH Transkriptionsfaktoren ablaufen.

8. Zusammenfassung und Perspektiven

Diese Arbeit zeigt die Justierung der Eisenmangelantwort durch die Phytohormone SA und JA und die bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren als mögliche Schaltstelle zwischen Stresssignalen und den Zielgenen der Eisenhomöostase. Der nächste Schritt zu einem tieferen Verständnis der bHLH Funktionen ist die Erstellung weiterer miRNA Konstrukte gegen *BHLH38* zur Kultivierung dauerhafter *4xbhlh* und *BHLH38/39* Doppelmutanten. Nur mithilfe einer vollständigen Nullmutante kann die Wichtigkeit der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren für die Eisenhomöostase beurteilt werden. *4xbhlh* und *BHLH38/39* Doppelmutanten können dazu genutzt werden die Notwendigkeit der bHLH Proteine für die Induktion von *FRO2* und *IRT1* zu überprüfen und Hinweise darauf zu erhalten, ob auch bHLH100/101 zur Aktivierung der Eisenaufnahmegene zusammen mit FIT beitragen. Diese Mutanten könnten ebenfalls dazu dienen, die im Genexpressionsexperiment gefundenen Ziele der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren zu verifizieren. Speziell die in *fit* und *3xbhlh* bei Eisenmangel signifikant schwächer exprimierte Gene *CYP82C4*, *COBL6*, *MLP3.17* und die in der *3xbhlh* gegenüber WT und *ein3/eil1* Mutante hoch regulierten Gene *F3L12.12*, *T15J14.6* und *T2E22.34* scheinen bisher ungeklärte Funktionen im Zusammenhang der Eisenhomöostase zu besitzen und sind sehr wahrscheinlich Ziele der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren. Genexpressionsanalysen dieser Ziele in bHLH Einzel- und Mehrfachmutanten könnten Aufschluss darüber geben, ob und welche der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren diese Ziele ansteuern. Gleichzeitig kann eine grundlegende molekularphysiologische Charakterisierung der KO Mutanten von *CYP82C4* (NASC Stock N501585), *COBL6* (NASC Stock N685090), *MLP3.17* (NASC Stock N520735), *F3L12.12* (NASC Stock N682995), *T15J14.6* (NASC Stock N527594) und *T2E22.34* (NASC Stock N507526) die Rolle dieser Gene in der Eisenhomöostase im Zusammenhang mit den bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren entschlüsseln.

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse im Kontext des SA Netzwerks deuten darauf hin, dass die vier bHLHs der Untergruppe Ib(2) Funktionen besitzen, die mit Seneszenz und Pathogenabwehr zusammenhängen. Da diese Prozesse mit der Eisenhomöostase in Verbindung zu stehen scheinen, können Genexpressionsexperimente mit der *3xbhlh* Mutante und anderen Eisenhomöostasemutanten in verschiedenen Seneszenzstadien Aufschluss darüber geben wie die Eisenhomöostase mit diesen Mechanismen in Verbindung steht. Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang die

Zusammenfassung und Perspektiven

Untersuchung der Expression der in der *3xbhlh* differentiell regulierten Gene *PR1*, *PR5* und *WRKY70*, die mutmaßlich im alternden Blatt bis zum Ende der Ressourcenrückgewinnung mit der Pathogenabwehr zusammenhängen.

Durch die Versuche mit der *BHLH39* Überexpressionslinie ist zu erwarten, dass *bHLH39* tatsächlich die *FIT* Transkription induzieren kann und damit die Eisenmangelantwort anschalten kann. Um das zu überprüfen könnten bereits vorhandene *pFIT::GUS* Linien mit der 39ox Linie gekreuzt und auf erhöhte GUS Aktivität untersucht werden. Eine solche Kreuzung könnte dann außerdem durch Darstellung der FIT Lokalisierung per GUS Färbung Hinweise über die Ursache der delokalisierten *FRO2* Aktivität in der 39ox Linie geben. Eine anschließende Frage ist, ob *bHLH39* alleine *FRO2* und *IRT1* induzieren kann. Ein Argument dafür könnte sein, dass zumindest *IRT1* auch in Abwesenheit von FIT in der *fit1-1* Mutante bei Eisenmangel noch induziert werden kann (Colangelo und Guerinot, 2004). Um die Fragestellung zu untersuchen wäre eine Transformation der *fit* Mutante mit dem *3xHA-BHLH39* Überexpressionskonstrukt durchzuführen. Erste Antworten auf diese Frage könnte bereits der Phänotyp geben. Die Komplementation des Phänotyps würde eine Aktivierung von *FRO2* und *IRT1* allein durch *BHLH39* sehr wahrscheinlich machen. Um das *bHLH39* Protein allerdings ohne die artifizielle konstitutive Expression und zusätzliche HA Markierung untersuchen zu können muss ein monoklonaler Antikörper gegen natives *bHLH39* im Western Blot gegen WT Proben eingesetzt werden. In der Gruppe wird bereits an *bHLH38* und *bHLH39* Antikörpern gearbeitet. Mithilfe dieser Antikörper kann dann die Abhängigkeit der Proteinmenge und -stabilität von den Eisenbedingungen im WT Hintergrund untersucht werden.

Um eine mögliche Ubiquitinierung des *bHLH39* nachzuweisen, könnte als erster Hinweis ohne größeren Aufwand die Behandlung von 39ox Pflanzen mit dem Proteasominhibitor MG132 durchgeführt werden. Sollten sich hier zeigen, dass die Proteinmenge bei -Fe erhöht ist, wäre das ein weiterer Hinweis auf proteasomalen Abbau. Das *bHLH39* Protein kann dann über die HA Markierung per Immunpräzipitation aufgereinigt werden und die Detektierung der Ubiquitinierung kann über kommerziell erhältliche Antikörper erfolgen. Als E3-Ligase, die die Ubiquitinierung bewerkstelligt, könnte BTS in Frage kommen, da für diese Ligase gezeigt wurde, dass sie die Eisenhomöostase negativ reguliert (Long et al., 2010).

Zusammenfassung und Perspektiven

Auch die Forschung an der Modulation der Eisenmangelantwort durch JA kann in Kürze weiter vorangetrieben werden. Dazu sind weitere Western Blot Analysen mit 3xHA-FIT Linien notwendig um zu zeigen, ob JA auf Proteinlevel auch auf FIT wirkt.

Einige der genannten Untersuchungen befinden sich in Vorbereitung oder werden bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt und werden in den kommenden Jahren entscheidend zum Verständnis der bHLH Ib(2) Transkriptionsfaktoren beitragen.

Solche Forschungsprojekte sollen schließlich helfen Nahrungsmittelpflanzen zu züchten, die mehr und besser verfügbares Eisen enthalten, um Krankheiten wie die Eisenmangelanämie einzudämmen.

9. Anhang

<i>3xbhlh</i> -Fe gegen WT -Fe							
AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT1G50180	4,5976	4,2943	0,3033	2,010	0,0002	erhöht	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
AT4G37030	4,5147	4,2068	0,3079	2,031	0,0000	erhöht	unknown function
AT3G17609	5,8274	5,5112	0,3162	2,071	0,0001	erhöht	<i>HYH</i> , homolog of HY5, Involved in phyB signaling pathway
AT4G15430	5,5975	5,2777	0,3197	2,088	0,0000	erhöht	early-responsive to dehydration stress family protein,
AT5G37940	5,5129	5,1842	0,3287	2,131	0,0000	erhöht	Zinc-binding dehydrogenase family protein, catalytic activity, oxidoreductase activity, oxidative stress
AT4G31870	5,2992	4,96611	0,3330	2,153	0,0002	erhöht	<i>ATGPX7</i> , glutathione peroxidase
AT4G12735	5,3889	5,0548	0,3340	2,158	0,0000	erhöht	unknown function
AT1G55240	5,0097	4,6692	0,3404	2,190	0,0000	erhöht	unknown function
AT3G21670	5,9590	5,6131	0,3458	2,217	0,0000	erhöht	Major facilitator superfamily protein, oligopeptide transport
AT3G54520	3,9452	3,59561	0,3495	2,236	0,0000	erhöht	unknown function

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT5G38000	5,1278	4,7718	0,3559	2,269	0,0000	erhöht	Zinc-binding dehydrogenase family protein, catalytic activity, oxidoreductase activity, response to oxidative stress
AT2G04050	4,7230	4,3665	0,3564	2,272	0,0000	erhöht	MATE efflux family protein, transporter activity
AT4G26150	5,4055	5,0480	0,3574	2,277	0,0000	erhöht	<i>CGAI</i> , member of GATA factor family of zinc finger transcription factors, circadian rhythm, gibberellic acid mediated signaling pathway, negative regulation of flower development and seed germination, response to cytokinin stimulus, response to light stimulus
AT5G55270	4,7220	4,36271	0,3592	2,287	0,0000	erhöht	unknown function
AT2G46800	5,4262	5,0664	0,3597	2,289	0,0000	erhöht	<i>CDF1</i> , member of the zinc transporter (ZAT) and cation diffusion facilitator (CDF) families, mediates Zn ion homeostasis
AT1G32900	6,2568	5,8933	0,3635	2,309	0,0000	erhöht	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G73000	4,9426	4,5739	0,3686	2,337	0,0002	erhöht	member of PYR (pyrabactin resistance)/PYL(PYR1-like)/RCAR (regulatory components of ABA receptor)
AT2G20800	5,2753	4,9053	0,3699	2,344	0,0000	erhöht	<i>NDB4</i> , NAD(P)H dehydrogenase B4
AT1G03055	4,9801	4,6096	0,3704	2,346	0,0001	erhöht	hypothetical protein

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT4G21490	4,1375	3,7596	0,3779	2,387	0,0001	erhöht	<i>NDB3</i> , NAD(P)H dehydrogenase B3
AT1G75100	6,0342	5,6482	0,3860	2,432	0,0002	erhöht	<i>JAC1</i> , Required for the chloroplast accumulation response, but not for the avoidance response. No molecular function known
AT5G53230	5,2706	4,8815	0,3891	2,449	0,0000	erhöht	unknown function
AT2G01520	6,5451	6,1534	0,3916	2,464	0,0000	erhöht	<i>MLP-LIKE PROTEIN 328</i> , cis-cinnamic acid responsive gene that is a member of the major latex protein-like gene family and plays a role in promoting vegetative growth and delaying flowering
AT4G00050	5,8033	5,4113	0,3920	2,466	0,0002	erhöht	<i>UNE10</i> , unfertilized embryo sac 10, sequence-specific DNA binding transcription factor activity
AT2G03230	4,7961	4,3976	0,3985	2,503	0,0000	erhöht	GCK domain-containing protein
AT2G41730	5,6469	5,2137	0,4332	2,711	0,0000	erhöht	process unknown
AT1G63960	4,0796	3,6424	0,4372	2,736	0,0001	erhöht	Copper transport protein family
AT1G02820	5,7160	5,2751	0,4409	2,759	0,0000	erhöht	LEA3 family protein, response to stress
AT3G54500	6,0207	5,5736	0,4470	2,799	0,0000	erhöht	unknown protein

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT3G28570	4,2201	3,7687	0,4514	2,827	0,0000	erhöht	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G55150	4,3074	3,8508	0,4566	2,861	0,0000	erhöht	unknown function
AT5G17300	5,6438	5,1834	0,4603	2,886	0,0000	erhöht	<i>REVEILLE 1</i> , Myb-like transcription factor that regulates hypocotyl growth by regulating free auxin levels in a time-of-day specific manner
AT5G50270	3,1790	2,70641	0,4725	2,968	0,0002	erhöht	F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein
AT2G21640	6,0200	5,5444	0,4756	2,989	0,0000	erhöht	unknown function, oxidative stress
AT5G66740	4,744	4,2670	0,4769	2,999	0,0000	erhöht	unknown function
AT2G21320	4,3415	3,8635	0,4779	3,006	0,0000	erhöht	B-box zinc finger family protein
AT5G24640	5,2026	4,7239	0,4786	3,010	0,0000	erhöht	process unknown
AT5G48490	6,8746	6,3949	0,4797	3,017	0,0001	erhöht	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT3G28890	3,3388	2,8435	0,4952	3,128	0,0001	erhöht	<i>RLP43</i> , endomembrane system, kinase activity, phosphorylation, signal transduction
AT5G52930	5,1706	4,6689	0,5017	3,174	0,0000	erhöht	unknown function

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT5G37990	5,8523	5,3429	0,5093	3,231	0,0000	erhöht	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases (Sam) superfamily protein, process unknown
AT3G58150	4,9876	4,4776	0,5100	3,235	0,0000	erhöht	unknown process
AT3G46300	4,2031	3,6685	0,5346	3,424	0,0001	erhöht	unknown function
AT1G55960	6,7233	6,1847	0,5385	3,456	0,0000	erhöht	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein, process unknown
AT5G42760	5,8241	5,2785	0,5455	3,512	0,0001	erhöht	Leucine carboxyl methyltransferase
AT5G37970	5,0576	4,4995	0,5580	3,614	0,0001	erhöht	Sam superfamily protein, unkown process
AT2G28820	5,0853	4,5199	0,5654	3,676	0,0000	erhöht	AT2G28820 obsolete and replaced by AT2G28830 on 2009-04-27 AT2G28830 : U-box E3 ubiquitin ligase involved in ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2
AT5G15850	5,6378	5,0483	0,5895	3,885	0,0000	erhöht	<i>COL1</i> , homologue of CONSTANS, circadian rhythm, intracellular, regulation of flower development
AT2G41260	4,2046	3,6148	0,5898	3,888	0,0000	erhöht	<i>M17</i> , Late-embryogenesis-abundant gene. Involved in the acquisition of desiccation tolerance during late phase of embryogenesis
AT1G64500	6,5049	5,9089	0,5960	3,944	0,0001	erhöht	Glutaredoxin family protein
AT5G09570	5,8663	5,2693	0,5969	3,953	0,0000	erhöht	Cox19-like CHCH family protein

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
TC311090	5,0489	4,42591	0,6229	4,197	0,0002	erhöht	tc Q9ZQH7_ARATH (Q9ZQH7) Cysteine proteinase, partial (25%) [TC311090]
AT1G77100	3,510	2,8527	0,6576	4,546	0,0002	erhöht	Peroxidase superfamily, response to oxidative stress
AT2G47520	5,0219	4,3582	0,6636	4,609	0,0000	erhöht	ERF71 (ethylene response factor) subfamily B-2 of ERF/AP2 transcription factor family
AT3G12320	5,6782	4,9926	0,6856	4,848	0,0000	erhöht	unknown protein
AT1G01060	5,5294	4,8398	0,6895	4,893	0,0000	erhöht	<i>LHY</i> , myb-related putative transcription factor involved in circadian rhythm
AT3G33084	3,476	2,7862	0,6898	4,895	0,0001	erhöht	transposable element gene
AT5G54550	4,5635	3,8676	0,6959	4,964	0,0000	erhöht	unknown function
AT2G41250	5,8155	5,1153	0,7001	5,014	0,0000	erhöht	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD)
AT5G03270	3,5410	2,8283	0,7126	5,160	0,0000	erhöht	lysine decarboxylase family protein, lysine biosynthetic process via diaminopimelate
AT1G62420	5,9775	5,2477	0,7298	5,367	0,0001	erhöht	unknown function
AT4G15248	5,0516	4,3157	0,7359	5,443	0,0000	erhöht	B-box type zinc finger family protein, process unknown

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT2G46830	4,2848	3,5486	0,7361	5,447	0,0000	erhöht	CCA1 function synergistically with LHY in regulating circadian rhythms of Arabidopsis
AT2G15020	6,5217	5,7788	0,7428	5,532	0,0000	erhöht	unknown protein
AT2G03130	5,0649	4,3088	0,7561	5,702	0,0000	erhöht	Ribosomal protein L12/ ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS family protein
AT5G54450	4,3587	3,5979	0,7607	5,764	0,0000	erhöht	unknown function
AT3G21150	5,0056	4,2150	0,7906	6,174	0,0001	erhöht	B BOX PROTEIN 32
AT1G12030	6,0526	5,2406	0,8120	6,486	0,0000	erhöht	unknown function
AT5G52940	5,4739	4,6440	0,8299	6,759	0,0000	erhöht	unknown function
AT5G54420	4,3381	3,4918	0,8462	7,019	0,0000	erhöht	unknown function
AT4G08875	4,5294	3,6344	0,8950	7,852	0,0000	erhöht	defensin-like (DEFL) family protein
AT3G02380	6,2312	5,3317	0,8995	7,934	0,0000	erhöht	<i>COL2</i> , B-box zinc-finger protein homologous to the flowering-time gene <i>CONSTANS</i>
AT4G27360	4,6238	3,6959	0,9279	8,470	0,0000	erhöht	Dynein light chain type 1 family protein
AT3G56700	4,1096	3,1573	0,9523	8,959	0,0000	erhöht	N-terminal protein myristoylation, cell redox homeostasis

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT2G41280	4,0446	2,9652	1,0794	12,006	0,0000	erhöht	<i>M10</i> , LEA (late embryogenesis abundant) protein
AT1G09790	4,5771	4,8816	-0,3045	2,016	0,0001	erniedrigt	<i>COBL6</i> , upregulated under iron deficiency
AT1G28190	5,2103	5,5211	-0,31079	2,045	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AT3G14210	6,4348	6,7503	-0,3155	2,067	0,0000	erniedrigt	<i>ESMI</i> , semidominant QTL, has epistatic effect on the epithiospecifier gene, represses nitrile formation and favors isothiocyanate production during glucosinolate hydrolysis
AT3G56400	5,4098	5,7262	-0,3164	2,072	0,0000	erniedrigt	member of WRKY Transcription Factor; Group III. Function as activator of SA-dependent defense genes and repressor of JA-regulated genes, suppression of JA-signaling is partly executed by NPR1.
AT1G21670	6,1346	6,4571	-0,32249	2,101	0,0000	erniedrigt	senescence-associated gene, upregulated during senescence
AT4G06746	5,2372	5,5805	-0,3433	2,204	0,0000	erniedrigt	member of the DREB subfamily A-5 of ERF/AP2 transcription factor family
AT3G47860	5,8148	6,1590	-0,34419	2,208	0,0000	erniedrigt	Located in thylakoid lumen, involved in protection of thylakoidal membrane lipids against reactive oxygen species, especially singlet oxygen, upon excess light.
AT1G65790	4,0931	4,4395	-0,3464	2,220	0,0000	erniedrigt	<i>ARK1</i> , alternatively spliced gene, functional transmembrane receptor serine/threonine kinase, alternate form may not have transmembrane domain

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT5G45500	6,2762	6,6298	-0,3536	2,257	0,0000	erniedrigt	RNI-like superfamily protein, function unknown
AT5G61610	3,9495	4,3044	-0,3549	2,264	0,0001	erniedrigt	Oleosin family protein
AT4G13575	4,5108	4,8799	-0,3691	2,339	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AT1G09750	6,2704	6,6421	-0,3716	2,353	0,0000	erniedrigt	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT3G07720	6,5355	6,9149	-0,3794	2,395	0,0000	erniedrigt	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein, response to zinc ion
AT5G55450	3,2988	3,6782	-0,37939	2,395	0,0000	erniedrigt	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT2G33830	6,8638	7,2512	-0,38739	2,440	0,0001	erniedrigt	Dormancy/auxin associated family protein
AT4G01525	5,4559	5,8454	-0,3894	2,451	0,0000	erniedrigt	Member of Sadhu non-coding retrotransposon family
AT1G52120	4,3710	4,7699	-0,39889	2,505	0,0000	erniedrigt	Mannose-binding lectin superfamily protein, function unknown
AT2G34655	4,1431	4,5572	-0,41409	2,594	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AT1G75040	4,8167	5,2450	-0,4283	2,681	0,0000	erniedrigt	<i>PR5</i> , Thaumatin-like protein, involved in response to pathogens, mRNA level changed after cutting the inflorescence stem indicating existence of network of signal transducing pathways as other stress-regulated genes (At5g01410, At3g17800, At1g29930)do not respond

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT4G25490	3,7036	4,1368	-0,4332	2,711	0,0001	erniedrigt	<i>CBF1</i> , Transcriptional activator, binds to the DRE/CRT regulatory elements, induces cold-regulated gene expression, increasing plant freezing tolerance, member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family, involved in response to low temperature and abscisic acid
BP653910	4,2556	4,7245	-0,4688	2,943	0,0000	erniedrigt	ug BP653910 RAFL19 Arabidopsis thaliana cDNA clone RAFL19-15-K07 3', mRNA sequence [BP653910]
AT2G26500	5,4686	5,9399	-0,47129	2,959	0,0000	erniedrigt	cytochrome b6f complex subunit, putative
AT3G07650	4,8382	5,3095	-0,4713	2,960	0,0000	erniedrigt	<i>COL9</i> , CONSTANS gene family, DNA-dependent, flowering, negative regulation of ld photoperiodism
AT2G39920	5,2837	5,7661	-0,4824	3,036	0,0000	erniedrigt	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase, response to cadmium ion
TA32559_3702	3,0825	3,5816	-0,4990	3,155	0,0000	erniedrigt	tc Q9ASR7_ARATH (Q9ASR7) AT3g60140/T2O9_120, partial (9%) [TC310500]
AT4G33980	5,4943	6,0024	-0,50809	3,221	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AT3G54730	4,0274	4,5401	-0,5126	3,256	0,0000	erniedrigt	ovate family protein 9
AT5G58310	3,6549	4,2035	-0,5486	3,536	0,0000	erniedrigt	<i>MES18</i> , required in healthy systemic tissues of infected plants to release active defense phytohormone SA from MeSA

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT -Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT2G30660	3,2612	3,8171	-0,5558	3,596	0,0000	erniedrigt	ATP-dependent caseinolytic protease/crotonase family
NP230685	2,7361	3,3126	-0,5764	3,771	0,0000	erniedrigt	tc GB AB015479.1 BAB08559.1 gene_id:MTE17.13~unknown protein [NP230685]
AT1G69140	3,5175	4,1081	-0,5906	3,895	0,0000	erniedrigt	pseudogene, hypothetical protein
AT4G04223	4,7130	5,3104	-0,59739	3,957	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AV562266	2,8041	3,4046	-0,6004	3,985	0.0003	erniedrigt	EST, associated Loci AT5G66053 ug AV562266 Arabidopsis thaliana green siliques Columbia Arabidopsis thaliana cDNA clone SQ167b02F 3', mRNA sequence [AV562266]
AT3G22380	3,5760	4,1890	-0,6130	4,102	0,0000	erniedrigt	<i>TIC</i> , nucleus-acting plant-specific clock regulator working close to the central oscillator, affecting circadian gating of light responses, regulates CCA1 and PRR9 from LHY,
AT4G31940	4,4448	5,1155	-0,6707	4,684	0,0000	erniedrigt	<i>CYP82C4</i> , cytochrome P450, family 82, subfamily C, heme- containing monooxygenase upregulated under Fe-deficiency through a FIT-dependent pathway
AT3G21460	4,0465	4,7216	-0,6751	4,732	0,0000	erniedrigt	Glutaredoxin family protein, cell redox homeostasis, electron carrier

Fortsetzung *3xbhlh* -Fe gegen WT –Fe

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe	Annotation
AT4G13250	5,6401	6,3170	-0,6768	4,752	0,0000	erniedrigt	<i>INYCI</i> , chlorophyll b reductase involved in the degradation of chlorophyll b and LHCII
AT1G70505	2,7378	3,4398	-0,7020	5,035	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AT4G01380	2,9241	3,7336	-0,80949	6,448	0,0000	erniedrigt	plastocyanin-like domain-containing protein, unknown
AT2G26020	2,9876	3,8878	-0,90019	7,946	0.0001	erniedrigt	<i>PDF1.2b</i> , Predicted to encode a PR protein
AT4G04601	2,9129	3,8279	-0,915	8,222	0,0000	erniedrigt	Unknown function
AT1G59500	2,7526	3,9220	-1,1694	14,770	0,0000	erniedrigt	<i>GH3.4</i> , IAA-amido synthase, conjugates Asp and other amino acids to auxin in vitro, response to auxin
AT3G56980	4,1874	5,9524	-1,7650	58,208	0,0000	erniedrigt	<i>bHLH039/ORG3</i> , iron deficiency induced, SA induced, bHLH transcription factor
AT3G30720	3,8108	5,5826	-1,7718	59,128	0,0000	erniedrigt	<i>QQS</i> , predicted to influence starch metabolism
AT2G41240	3,1134	6,2777	-3,1643	1459,822	0,0000	erniedrigt	<i>bHLH100</i> , iron deficiency induced, bHLH tf

Die aufgeführten Gene sind im Vergleich WT-Fe gegen *3xbhlh*-Fe differentiell exprimiert. Ein negativer log Ratio Wert zeigt an, dass das Gen in der Mutante im Vergleich zum WT herunterreguliert ist, ein positiver zeigt an, dass das Gen in der Mutante stärker exprimiert ist.

Es wurden nur Gene mit einem P-Wert < 0,05 und einem fold change > 2 in die Liste aufgenommen.

Tabelle zu Venn Diagramm

3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap WT+Fe gegen WT-Fe

Schnittmenge 21 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
At4g31870	5,2992	4,96611	0,3330	2,153	0,0002	erhöht
At1g32900	6,2568	5,8933	0,3635	2,309	0,0000	erhöht
At4g00050	5,8033	5,4113	0,3920	2,466	0,0002	erhöht
At2g04050	4,7230	4,3665	0,3564	2,272	0,0000	erhöht
At2g21640	6,0200	5,5444	0,4756	2,989	0,0000	erhöht
At3g12320	5,6782	4,9926	0,6856	4,848	0,0000	erhöht
At1g01060	5,5294	4,8398	0,6895	4,893	0,0000	erhöht
At2g46830	4,2848	3,5486	0,7361	5,447	0,0000	erhöht
At2g15020	6,5217	5,7788	0,7428	5,532	0,0000	erhöht
At1g12030	6,0526	5,2406	0,8120	6,486	0,0000	erhöht
At3g02380	6,2312	5,3317	0,8995	7,934	0,0000	erhöht
At3g47860	5,8148	6,1590	-0,3441	2,208	0,0000	erniedrigt
At1g09750	6,2704	6,6421	-0,3716	2,353	0,0000	erniedrigt
At3g07720	6,5355	6,9149	-0,3794	2,395	0,0000	erniedrigt
At2g33830	6,8638	7,2512	-0,38739	2,440	0.0001	erniedrigt
At2g26500	5,4686	5,9399	-0,4712	2,959	0,0000	erniedrigt
At2g39920	5,2837	5,7661	-0,4824	3,036	0,0000	erniedrigt
At4g31940	4,4448	5,1155	-0,6707	4,684	0,0000	erniedrigt
At4g13250	5,6401	6,3170	-0,6768	4,752	0,0000	erniedrigt
At3g56980	4,1874	5,9524	-1,7650	58,208	0,0000	erniedrigt
At2g41240	3,1134	6,2777	-3,1643	1459,822	0,0000	erniedrigt

Tabelle zu Venn Diagramm

3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap WT+Fe gegen WT-Fe

Differenzmenge 100 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
AT1G50180	4,5976	4,2943	0,3033	2,010	0,0002	erhöht
AT4G37030	4,5147	4,2068	0,3079	2,031	0,0000	erhöht
AT3G17609	5,8274	5,5112	0,3162	2,071	0,0001	erhöht
AT4G15430	5,5975	5,2777	0,3197	2,088	0,0000	erhöht
AT5G37940	5,5129	5,1842	0,3287	2,131	0,0000	erhöht
AT4G12735	5,3889	5,0548	0,3340	2,158	0,0000	erhöht
AT1G55240	5,0097	4,6692	0,3404	2,190	0,0000	erhöht
AT3G21670	5,9590	5,6131	0,3458	2,217	0,0000	erhöht
AT3G54520	3,9452	3,5956	0,3495	2,236	0,0000	erhöht
AT5G38000	5,1278	4,7718	0,3559	2,269	0,0000	erhöht
AT4G26150	5,4055	5,0480	0,3574	2,277	0,0000	erhöht
AT5G55270	4,7220	4,3627	0,3592	2,287	0,0000	erhöht
AT2G46800	5,4262	5,0664	0,3597	2,289	0,0000	erhöht
AT1G73000	4,9426	4,5739	0,3686	2,337	0,0002	erhöht
AT2G20800	5,2753	4,9053	0,3699	2,344	0,0000	erhöht
AT1G03055	4,9801	4,6096	0,3704	2,346	0,0001	erhöht
AT4G21490	4,1375	3,7596	0,3779	2,387	0,0001	erhöht
AT1G75100	6,0342	5,6482	0,3860	2,432	0,0002	erhöht
AT5G53230	5,2706	4,8815	0,3891	2,449	0,0000	erhöht
AT2G01520	6,5451	6,1534	0,3916	2,464	0,0000	erhöht
AT2G03230	4,7961	4,3976	0,3985	2,503	0,0000	erhöht
AT2G41730	5,6469	5,2137	0,4332	2,711	0,0000	erhöht
AT1G63960	4,0796	3,6424	0,4372	2,736	0,0001	erhöht
AT1G02820	5,7160	5,2751	0,4409	2,759	0,0000	erhöht

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \cap WT+Fe gegen WT-Fe**

Differenzmenge 100 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
AT3G54500	6,0207	5,5736	0,4470	2,799	0,0000	erhöht
AT3G28570	4,2201	3,7687	0,4514	2,827	0,0000	erhöht
AT5G55150	4,3074	3,8508	0,4566	2,861	0,0000	erhöht
AT5G17300	5,6438	5,1834	0,4603	2,886	0,0000	erhöht
AT5G50270	3,1790	2,70641	0,4725	2,968	0,0002	erhöht
AT5G66740	4,744	4,2670	0,4769	2,999	0,0000	erhöht
AT2G21320	4,3415	3,8635	0,4779	3,006	0,0000	erhöht
AT5G24640	5,2026	4,7239	0,4786	3,010	0,0000	erhöht
AT5G48490	6,8746	6,3949	0,4797	3,017	0,0001	erhöht
AT3G28890	3,3388	2,8435	0,4952	3,128	0,0001	erhöht
AT5G52930	5,1706	4,6689	0,5017	3,174	0,0000	erhöht
AT5G37990	5,8523	5,3429	0,5093	3,231	0,0000	erhöht
AT3G58150	4,9876	4,4776	0,5100	3,235	0,0000	erhöht
AT3G46300	4,2031	3,6685	0,5346	3,424	0,0001	erhöht
AT1G55960	6,7233	6,1847	0,5385	3,456	0,0000	erhöht
AT5G42760	5,8241	5,2785	0,5455	3,512	0,0001	erhöht
AT5G37970	5,0576	4,4995	0,5580	3,614	0,0001	erhöht
AT2G28820	5,0853	4,5199	0,5654	3,676	0,0000	erhöht
AT5G15850	5,6378	5,0483	0,5895	3,885	0,0000	erhöht
AT2G41260	4,2046	3,6148	0,5898	3,888	0,0000	erhöht
AT1G64500	6,5049	5,9089	0,5960	3,944	0,0001	erhöht
AT5G09570	5,8663	5,2693	0,5969	3,953	0,0000	erhöht
TC311090	5,0489	4,4259	0,6229	4,197	0,0002	erhöht

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap WT+Fe gegen WT-Fe
Differenzmenge 100 Gene

AGI Code	MW 3xbhlh	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation 3xbhlh -Fe
AT1G77100	3,510	2,8527	0,6576	4,546	0,0002	erhöht
AT2G47520	5,0219	4,3582	0,6636	4,609	0,0000	erhöht
AT3G33084	3,476	2,7862	0,6898	4,895	0,0001	erhöht
AT5G54550	4,5635	3,8676	0,6959	4,964	0,0000	erhöht
AT2G41250	5,8155	5,1153	0,7001	5,014	0,0000	erhöht
AT5G03270	3,5410	2,8283	0,7126	5,160	0,0000	erhöht
AT1G62420	5,9775	5,2477	0,7298	5,367	0,0001	erhöht
AT4G15248	5,0516	4,3157	0,7359	5,443	0,0000	erhöht
AT2G03130	5,0649	4,3088	0,7561	5,702	0,0000	erhöht
AT5G54450	4,3587	3,5979	0,7607	5,764	0,0000	erhöht
AT3G21150	5,0056	4,2150	0,7906	6,174	0,0001	erhöht
AT5G52940	5,4739	4,6440	0,8299	6,759	0,0000	erhöht
AT5G54420	4,3381	3,4918	0,8462	7,019	0,0000	erhöht
AT4G08875	4,5294	3,6344	0,8950	7,852	0,0000	erhöht
AT4G27360	4,6238	3,6959	0,9279	8,470	0,0000	erhöht
AT3G56700	4,1096	3,1573	0,9523	8,959	0,0000	erhöht
AT2G41280	4,0446	2,9652	1,0794	12,006	0,0000	erhöht
AT1G09790	4,5771	4,8816	-0,3045	2,016	0,0001	erniedrigt
AT1G28190	5,2103	5,5211	-0,3107	2,045	0,0000	erniedrigt
AT3G14210	6,4348	6,7503	-0,3155	2,067	0,0000	erniedrigt
AT3G56400	5,4098	5,7262	-0,3164	2,072	0,0000	erniedrigt
AT1G21670	6,1346	6,4571	-0,3224	2,101	0,0000	erniedrigt
AT4G06746	5,2372	5,5805	-0,3433	2,204	0,0000	erniedrigt
AT1G65790	4,0931	4,4395	-0,3464	2,220	0,0000	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \cap WT+Fe gegen WT-Fe**

Differenzmenge 100 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
AT4G12290	5,5447	5,8981	-0,3534	2,256	0,0000	erniedrigt
AT5G45500	6,2762	6,6298	-0,3536	2,257	0,0000	erniedrigt
AT5G61610	3,9495	4,3044	-0,3549	2,264	0,0001	erniedrigt
AT4G13575	4,5108	4,8799	-0,3691	2,339	0,0000	erniedrigt
AT5G55450	3,2988	3,6782	-0,3793	2,395	0,0000	erniedrigt
AT4G01525	5,4559	5,8454	-0,3894	2,451	0,0000	erniedrigt
AT1G52120	4,3710	4,7699	-0,3988	2,505	0,0000	erniedrigt
AT2G34655	4,1431	4,5572	-0,4140	2,594	0,0000	erniedrigt
AT1G75040	4,8167	5,2450	-0,4283	2,681	0,0000	erniedrigt
AT4G25490	3,7036	4,1368	-0,4332	2,711	0,0001	erniedrigt
BP653910	4,2556	4,7245	-0,4688	2,943	0,0000	erniedrigt
AT3G07650	4,8382	5,3095	-0,4713	2,960	0,0000	erniedrigt
TA32559_3702	3,0825	3,5816	-0,4990	3,155	0,0000	erniedrigt
AT4G33980	5,4943	6,0024	-0,5080	3,221	0,0000	erniedrigt
AT3G54730	4,0274	4,5401	-0,5126	3,256	0,0000	erniedrigt
AT5G58310	3,6549	4,2035	-0,5486	3,536	0,0000	erniedrigt
AT2G30660	3,2612	3,8171	-0,5558	3,596	0,0000	erniedrigt
NP230685	2,7361	3,3126	-0,5764	3,771	0,0000	erniedrigt
AT1G69140	3,5175	4,1081	-0,5906	3,895	0,0000	erniedrigt
AT4G04223	4,7130	5,3104	-0,5973	3,957	0,0000	erniedrigt
AV562266	2,8041	3,4046	-0,6004	3,985	0,0003	erniedrigt
AT3G22380	3,5760	4,1890	-0,6130	4,102	0,0000	erniedrigt
AT3G21460	4,0465	4,7216	-0,6751	4,732	0,0000	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \cap WT+Fe gegen WT-Fe**

Differenzmenge 100 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
AT1G70505	2,7378	3,4398	-0,7020	5,035	0,0000	erniedrigt
AT4G01380	2,9241	3,7336	-0,80949	6,448	0,0000	erniedrigt
AT2G26020	2,9876	3,8878	-0,9001	7,946	0.0001	erniedrigt
AT4G04601	2,9129	3,8279	-0,9150	8,222	0,0000	erniedrigt
AT1G59500	2,7526	3,9220	-1,1694	14,770	0,0000	erniedrigt
AT3G30720	3,8108	5,5826	-1,7718	59,128	0,0000	erniedrigt

Die Gene der zweiten Differenzmenge **WT+Fe gegen WT-Fe \ WT-Fe gegen *3xbhlh*-Fe** entsprechen der in Lingam et al 2011 veröffentlichten Liste der Eisenmarkergene abzüglich der hier aufgelisteten 21 Gene der Schnittmenge. Ein negativer log Ratio Wert zeigt an, dass das Gen in der Mutante im Vergleich zum WT herunterreguliert ist, ein positiver zeigt an, dass das Gen in der Mutante stärker exprimiert ist. Es wurden nur Gene mit einem P-Wert < 0,05 und einem fold change > 2 in die Liste aufgenommen.

Tabelle zu Venn Diagramm

***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \cap WT-Fe gegen WT-Fe+SA**

Schnittmenge 49 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
AT1G50180	4,5976	4,2943	0,3033	2,010	0,0002	erhöht
AT4G37030	4,5147	4,2068	0,3079	2,031	0,0000	erhöht
AT3G17609	5,8274	5,5112	0,3162	2,071	0,0001	erhöht
AT4G12735	5,3889	5,0548	0,3340	2,158	0,0000	erhöht
AT3G21670	5,9590	5,6131	0,3458	2,217	0,0000	erhöht
AT3G54520	3,9452	3,5956	0,3495	2,236	0,0000	erhöht
AT2G04050	4,7230	4,3665	0,3564	2,272	0,0000	erhöht
AT4G26150	5,4055	5,0480	0,3574	2,277	0,0000	erhöht
AT5G55270	4,7220	4,3627	0,3592	2,287	0,0000	erhöht
AT1G73000	4,9426	4,5739	0,3686	2,337	0,0002	erhöht
AT4G21490	4,1375	3,7596	0,3779	2,387	0,0001	erhöht
AT2G41730	5,6469	5,2137	0,4332	2,711	0,0000	erhöht
AT5G55150	4,3074	3,8508	0,4566	2,861	0,0000	erhöht
AT2G21640	6,0200	5,5444	0,4756	2,989	0,0000	erhöht
AT5G24640	5,2026	4,7239	0,4786	3,010	0,0000	erhöht
AT5G48490	6,8746	6,3949	0,4797	3,017	0,0001	erhöht
AT3G28890	3,3388	2,8435	0,4952	3,128	0,0001	erhöht
AT3G58150	4,9876	4,4776	0,5100	3,235	0,0000	erhöht
AT3G46300	4,2031	3,6685	0,5346	3,424	0,0001	erhöht
AT2G28820	5,0853	4,5199	0,5654	3,676	0,0000	erhöht
AT5G15850	5,6378	5,0483	0,5895	3,885	0,0000	erhöht
AT5G09570	5,8663	5,2693	0,5969	3,953	0,0000	erhöht

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap WT-Fe gegen WT-Fe+SA

Schnittmenge 49 Gene

AGI Code	MW 3xbhlh	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation 3xbhlh -Fe
tC311090	5,0489	4,4259	0,6229	4,197	0,0002	erhöht
AT2G47520	5,0219	4,3582	0,6636	4,609	0,0000	erhöht
AT1G01060	5,5294	4,8398	0,6895	4,893	0,0000	erhöht
AT5G54550	4,5635	3,8676	0,6959	4,964	0,0000	erhöht
AT1G62420	5,9775	5,2477	0,7298	5,367	0,0001	erhöht
AT2G46830	4,2848	3,5486	0,7361	5,447	0,0000	erhöht
AT1G12030	6,0526	5,2406	0,8120	6,486	0,0000	erhöht
AT5G52940	5,4739	4,6440	0,8299	6,759	0,0000	erhöht
AT4G08875	4,5294	3,6344	0,8950	7,852	0,0000	erhöht
AT3G56400	5,4098	5,7262	-0,3164	2,072	0,0000	erniedrigt
AT1G65790	4,0931	4,4395	-0,3464	2,220	0,0000	erniedrigt
AT4G12290	5,5447	5,8981	-0,3534	2,256	0,0000	erniedrigt
AT1G09750	6,2704	6,6421	-0,3716	2,353	0,0000	erniedrigt
AT5G55450	3,2988	3,6782	-0,3793	2,395	0,0000	erniedrigt
AT2G33830	6,8638	7,2512	-0,3873	2,440	0,0001	erniedrigt
AT1G52120	4,3710	4,7699	-0,3988	2,505	0,0000	erniedrigt
AT1G75040	4,8167	5,2450	-0,4283	2,681	0,0000	erniedrigt
AT4G25490	3,7036	4,1368	-0,4332	2,711	0,0001	erniedrigt
BP653910	4,2556	4,7245	-0,4688	2,943	0,0000	erniedrigt
tA32559_3702	3,0825	3,5816	-0,4990	3,155	0,0000	erniedrigt
AT2G30660	3,2612	3,8171	-0,5558	3,596	0,0000	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \cap WT-Fe gegen WT-Fe+SA**

Schnittmenge 49 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
NP230685	2,7361	3,3126	-0,5764	3,771	0,0000	erniedrigt
AT1G69140	3,5175	4,1081	-0,5906	3,895	0,0000	erniedrigt
AT3G21460	4,0465	4,7216	-0,6751	4,732	0,0000	erniedrigt
AT1G59500	2,7526	3,9220	-1,1694	14,770	0,0000	erniedrigt

Tabelle zu Venn Diagramm
***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \ WT-Fe gegen WT-Fe+SA**

Differenzmenge 72 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i>	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe
AT4G15430	5,5975	5,2777	0,3197	2,088	0,0000	erhöht
AT5G37940	5,5129	5,1842	0,3287	2,131	0,0000	erhöht
AT4G31870	5,2992	4,9661	0,3330	2,153	0,0002	erhöht
AT1G55240	5,0097	4,6692	0,3404	2,190	0,0000	erhöht
AT5G38000	5,1278	4,7718	0,3559	2,269	0,0000	erhöht
AT2G46800	5,4262	5,0664	0,3597	2,289	0,0000	erhöht
AT1G32900	6,2568	5,8933	0,3635	2,309	0,0000	erhöht
AT1G03055	4,9801	4,6096	0,3704	2,346	0,0001	erhöht
AT1G75100	6,0342	5,6482	0,3860	2,432	0,0002	erhöht
AT5G53230	5,2706	4,8815	0,3891	2,449	0,0000	erhöht
AT2G01520	6,5451	6,1534	0,3916	2,464	0,0000	erhöht
AT4G00050	5,8033	5,4113	0,3920	2,466	0,0002	erhöht
AT2G03230	4,7961	4,3976	0,3985	2,503	0,0000	erhöht
AT1G63960	4,0796	3,6424	0,4372	2,736	0,0001	erhöht
AT1G02820	5,7160	5,2751	0,4409	2,759	0,0000	erhöht
AT3G54500	6,0207	5,5736	0,4470	2,799	0,0000	erhöht
AT3G28570	4,2201	3,7687	0,4514	2,827	0,0000	erhöht
AT3G46300	4,2031	3,6685	0,5346	3,424	0,0001	erhöht
AT1G55960	6,7233	6,1847	0,5385	3,456	0,0000	erhöht
AT5G42760	5,8241	5,2785	0,5455	3,512	0,0001	erhöht
AT5G37970	5,0576	4,4995	0,5580	3,614	0,0001	erhöht
AT2G28820	5,0853	4,5199	0,5654	3,676	0,0000	erhöht
AT5G15850	5,6378	5,0483	0,5895	3,885	0,0000	erhöht

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \ WT-Fe gegen WT-Fe+SA

Differenzmenge 72 Gene

AGI Code	MW 3xbhlh	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation 3xbhlh -Fe
AT2G41260	4,2046	3,6148	0,5898	3,888	0,0000	erhöht
AT1G64500	6,5049	5,9089	0,5960	3,944	0,0001	erhöht
AT5G09570	5,8663	5,2693	0,5969	3,953	0,0000	erhöht
TC311090	5,0489	4,4259	0,6229	4,197	0,0002	erhöht
AT1G77100	3,5100	2,8527	0,6576	4,546	0,0002	erhöht
AT3G12320	5,6782	4,9926	0,6856	4,848	0,0000	erhöht
AT2G41250	5,8155	5,1153	0,7001	5,014	0,0000	erhöht
AT2G15020	6,5217	5,7788	0,7428	5,532	0,0000	erhöht
AT2G03130	5,0649	4,3088	0,7561	5,702	0,0000	erhöht
AT5G54450	4,3587	3,5979	0,7607	5,764	0,0000	erhöht
AT3G21150	5,0056	4,2150	0,7906	6,174	0,0001	erhöht
AT1G12030	6,0526	5,2406	0,8120	6,486	0,0000	erhöht
AT5G52940	5,4739	4,6440	0,8299	6,759	0,0000	erhöht
AT5G54420	4,3381	3,4918	0,8462	7,019	0,0000	erhöht
AT4G08875	4,5294	3,6344	0,8950	7,852	0,0000	erhöht
AT3G02380	6,2312	5,3317	0,8995	7,934	0,0000	erhöht
AT4G27360	4,6238	3,6959	0,9279	8,470	0,0000	erhöht
AT3G56700	4,1096	3,1573	0,9523	8,959	0,0000	erhöht
AT2G41280	4,0446	2,9652	1,0794	12,006	0,0000	erhöht
AT1G09790	4,5771	4,8816	-0,3045	2,016	0,0001	erniedrigt
AT1G28190	5,2103	5,5211	-0,3107	2,045	0,0000	erniedrigt
AT3G14210	6,4348	6,7503	-0,3155	2,067	0,0000	erniedrigt
AT1G21670	6,1346	6,4571	-0,3224	2,101	0,0000	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \ WT-Fe gegen WT-Fe+SA

Differenzmenge 72 Gene

AGI Code	MW 3xbhlh	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation 3xbhlh -Fe
AT4G06746	5,2372	5,5805	-0,3433	2,204	0,0000	erniedrigt
AT3G47860	5,8148	6,1590	-0,3441	2,208	0,0000	erniedrigt
AT5G45500	6,2762	6,6298	-0,3536	2,257	0,0000	erniedrigt
AT5G61610	3,9495	4,3044	-0,3549	2,264	0,0001	erniedrigt
AT4G13575	4,5108	4,8799	-0,3691	2,339	0,0000	erniedrigt
AT3G07720	6,5355	6,9149	-0,3794	2,395	0,0000	erniedrigt
AT4G01525	5,4559	5,8454	-0,3894	2,451	0,0000	erniedrigt
AT2G34655	4,1431	4,5572	-0,4140	2,594	0,0000	erniedrigt
AT2G26500	5,4686	5,9399	-0,4712	2,959	0,0000	erniedrigt
AT3G07650	4,8382	5,3095	-0,4713	2,960	0,0000	erniedrigt
AT2G39920	5,2837	5,7661	-0,4824	3,036	0,0000	erniedrigt
AT4G33980	5,4943	6,0024	-0,5080	3,221	0,0000	erniedrigt
AT3G54730	4,0274	4,5401	-0,5126	3,256	0,0000	erniedrigt
AT5G58310	3,6549	4,2035	-0,5486	3,536	0,0000	erniedrigt
AT4G04223	4,7130	5,3104	-0,5973	3,957	0,0000	erniedrigt
AV562266	2,8041	3,4046	-0,6004	3,985	0,0003	erniedrigt
AT3G22380	3,5760	4,1890	-0,6130	4,102	0,0000	erniedrigt
AT4G31940	4,4448	5,1155	-0,6707	4,684	0,0000	erniedrigt
AT4G13250	5,6401	6,3170	-0,6768	4,752	0,0000	erniedrigt
AT1G70505	2,7378	3,4398	-0,7020	5,035	0,0000	erniedrigt
AT4G01380	2,9241	3,7336	-0,8094	6,448	0,0000	erniedrigt
AT2G26020	2,9876	3,8878	-0,9001	7,946	0,0001	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm
3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \ WT-Fe gegen WT-Fe+SA

Differenzmenge 72 Gene

AGI Code	MW 3xbhlh	MW WT	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation 3xbhlh -Fe
AT4G04601	2,9129	3,8279	-0,9150	8,222	0,0000	erniedrigt
AT3G56980	4,1874	5,9524	-1,7650	58,208	0,0000	erniedrigt
AT3G30720	3,8108	5,5826	-1,7718	59,128	0,0000	erniedrigt
AT2G41240	3,1134	6,2777	-3,1643	1459,822	0,0000	erniedrigt

Ein negativer log Ratio Wert zeigt an, dass das Gen in der Mutante im Vergleich zum WT herunterreguliert ist, ein positiver zeigt an, dass das Gen in der Mutante stärker exprimiert ist. Es wurden nur Gene mit einem P-Wert < 0,05 und einem fold change > 2 in die Liste aufgenommen. Die Gene der Differenzmenge WT-Fe gegen WT-Fe+SA \ 3xbhlh -Fe gegen WT -Fe sind hier aus Platzgründen nicht aufgelistet, können aber online eingesehen werden. Die Zugangsdaten sind im Material und Methoden Teil zu finden

Tabelle zu Venn Diagramm

3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap *3xbhlh*-Fe gegen *3xbhlh*-Fe +SA

Schnittmenge 46 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i> - Fe	MW <i>3xbhlh</i> -Fe+SA	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe+SA
AT1G50180	4,5976	4,9434	-0,3458	2,217	0,0000	erhöht
AT4G06746	5,2372	5,6611	-0,4239	2,653	0,0000	Erhöht
AT1G28190	5,2103	5,7233	-0,5131	3,259	0,0000	erhöht
AV562266	2,8041	3,3180	-0,5141	3,266	0,0020	erhöht
AT2G21640	6,0200	6,5744	-0,5544	3,584	0,0000	erhöht
TA32559_3702	4,3710	4,9256	-0,5547	3,586	0,0000	erhöht
AT1G52120	5,5447	6,1418	-0,5972	3,955	0,0000	erhöht
AT3G58150	4,9876	5,6692	-0,6817	4,804	0,0000	erhöht
AT1G75040	4,8167	5,5552	-0,7386	5,477	0,0000	erhöht
AT2G04050	4,7230	5,6237	-0,9007	7,956	0,0000	erhöht
AT2G47520	5,0219	5,9432	-0,9213	8,342	0,0000	erhöht
AT4G12735	5,3889	6,3754	-0,9865	9,693	0,0000	erhöht
AT3G28890	3,3388	4,3513	-1,0125	10,292	0,0000	erhöht
AT2G33830	3,2612	4,2891	-1,0279	10,663	0,0000	erhöht
AT2G41730	5,6469	6,7815	-1,1346	13,636	0,0000	erhöht
AT5G24640	5,2026	6,4683	-1,2657	18,441	0,0000	erhöht
AT3G54520	3,9452	5,2240	-1,2788	19,002	0,0000	erhöht
AT4G37030	4,5147	5,8712	-1,3565	22,729	0,0000	erhöht

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm

3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap *3xbhlh*-Fe gegen *3xbhlh*-Fe +SA

Schnittmenge 46 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i> - Fe	MW <i>3xbhlh</i> -Fe+SA	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe+SA
AT1G65790	4,0931	5,6529	-1,5598	36,291	0,0000	erhöht
AT1G02820	2,7361	4,2638	-1,5277	33,712	0,0000	erhöht
NP230685	3,0825	4,7257	-1,6432	43,983	0,0000	erhöht
AT4G12290	3,2988	4,9663	-1,6675	46,505	0,0000	erhöht
AT3G56400	5,4098	7,3982	-1,9884	97,364	0,0000	erhöht
AT5G55150	4,3074	6,4401	-2,1327	135,765	0,0000	erhöht
AT5G55450	6,8638	6,5594	0,3044	2,015	0,0031	erniedrigt
AT2G46800	5,4262	5,0753	0,3509	2,243	0,0000	erniedrigt
AT5G38000	5,1278	4,7581	0,3697	2,342	0,0000	erniedrigt
AT5G37940	5,5129	5,1066	0,4063	2,548	0,0000	erniedrigt
AT5G42760	5,8241	5,4043	0,4198	2,628	0,0041	erniedrigt
AT1G09750	5,7160	5,2793	0,4367	2,733	0,0000	erniedrigt
AT5G66740	4,7440	4,2754	0,4686	2,941	0,0000	erniedrigt
AT5G50270	3,1790	2,7089	0,4701	2,951	0,0002	erniedrigt
AT5G37970	5,0576	4,5862	0,4714	2,960	0,0011	erniedrigt
AT2G15020	6,5217	6,0480	0,4737	2,976	0,0043	erniedrigt
AT3G21460	6,2704	5,7961	0,4743	2,980	0,0000	erniedrigt
AT2G01520	6,5451	6,0314	0,5137	3,263	0,0000	erniedrigt
AT3G21670	5,9590	5,4382	0,5208	3,317	0,0000	erniedrigt
AT1G77100	3,5104	2,9709	0,5395	3,463	0,0028	erniedrigt
AT1G55960	6,7233	6,1788	0,5445	3,503	0,0000	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle zu Venn Diagramm

3xbhlh-Fe gegen WT-Fe \cap *3xbhlh*-Fe gegen *3xbhlh*-Fe +SA

Schnittmenge 46 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i> -Fe	MW <i>3xbhlh</i> -Fe+SA	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe+SA
AT5G37990	5,8523	5,3051	0,5472	3,525	0,0000	erniedrigt
AT4G26150	5,4055	4,8521	0,5534	3,575	0,0000	erniedrigt
AT5G48490	6,8746	6,3125	0,5621	3,648	0,0000	erniedrigt
AT3G02380	6,2312	5,6077	0,6235	4,202	0,0019	erniedrigt
AT2G30660	4,0465	3,2834	0,7631	5,795	0,0000	erniedrigt
TC311090	5,0489	4,2186	0,8303	6,765	0,0000	erniedrigt
AT3G46300	4,2031	3,3233	0,8798	7,582	0,0000	erniedrigt

Ein negativer log Ratio Wert zeigt an, dass das Gen in der Mutante bei -Fe im Vergleich zu -Fe+SA herunterreguliert ist, ein positiver zeigt an, dass das Gen in der Mutante bei -Fe stärker exprimiert ist als bei -Fe+SA. Es wurden nur Gene mit einem P-Wert < 0,05 und einem fold change > 2 in die Liste aufgenommen.

Tabelle zu Venn Diagramm

***3xbhlh*-Fe gegen WT-Fe \cap *3xbhlh*-Fe +SA gegen WT-Fe+SA**

Schnittmenge 20 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i> -Fe+SA	MW WT -Fe+SA	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i> -Fe+SA
AT1G32900	6,2777	5,9630	0,3147	2.063	0,0000	erhöht
AT2G03230	5,0299	4,6557	0,3742	2.367	0,0000	erhöht
AT2G41250	5,7344	5,1678	0,5666	3.686	0,0000	erhöht
AT5G53230	5,2169	4,9114	0,3055	4.094	0,0000	erhöht
AT3G28570	4,1052	3,4781	0,6271	4.237	0,0000	erhöht
AT5G52940	5,5713	5,0675	0,5038	4.3525	0,0000	erhöht
AT2G41280	3,9862	2,8992	1,0870	12.217	0,0000	erhöht
AT3G56700	4,4929	3,1606	1,3322	21.492	0,0000	erhöht
AT3G07720	6,7722	7,1234	-0,3512	2.244	0,0000	erniedrigt
AT3G54730	3,9655	4,3399	-0,3744	2.368	0,0000	erniedrigt
AT4G01525	5,3800	5,7980	-0,4181	2.618	0,0000	erniedrigt
AT1G52120	4,9257	5,3528	-0,4271	2.673	0,0000	erniedrigt
AT1G09790	4,4111	4,8635	-0,4525	2.834	0,0000	erniedrigt
AT3G21460	3,2834	3,7788	-0,4954	3.128	0,0000	erniedrigt
AT4G04223	4,8294	5,4376	-0,6083	4.057	0,0000	erniedrigt
AT4G31940	4,5202	5,2351	-0,7149	5.186	0,0000	erniedrigt
AT4G04601	3,1598	3,9782	-0,8184	6.582	0,0000	erniedrigt
AT3G30720	4,2982	5,6039	-1,3057	20.216	0,0000	erniedrigt
AT5G45500	6,5591	6,9093	-0,3503	4.5323	0,0000	erniedrigt
AT3G56980	4,3901	6,2971	-1,9070	80.723	0,0000	erniedrigt

Tabelle zu Venn Diagramm

3xbhlh-Fe gegen WT-Fe / *3xbhlh*-Fe +SA gegen WT-Fe+SA

Differenzmenge 16 Gene

AGI Code	MW <i>3xbhlh</i> -Fe+SA	MW WT -Fe+SA	Log Ratio	Fold Change	p-Wert	Regulation <i>3xbhlh</i>
AT2G20720	5,2744	4,9456	0,3288	2,132	0	erhöht
AT1G48930	5,3430	4,9599	0,3831	2,415	0	erhöht
AT1G54950	4,4430	4,0558	0,3872	2,438	0	erhöht
AT1G73603	3,1965	2,6923	0,5042	3,193	0	erhöht
AT4G39675	5,3169	4,8091	0,5078	3,219	0	erhöht
AT1G21850	3,8825	3,1279	0,7546	5,683	0	erhöht
AT1G68765	4,7430	4,0320	0,7110	4,176	0	erniedrigt
BT025685	3,0396	3,7543	-0,7148	5,185	0	erniedrigt
AT5G07530	3,2203	3,9222	-0,7019	5,033	0	erniedrigt
AT3G45060	4,5219	5,0272	-0,5054	3,201	0	erniedrigt
AT1G48325	3,5234	3,9952	-0,4718	2,963	0	erniedrigt
AT2G36885	5,0959	5,5603	-0,4645	2,914	0	erniedrigt
AT5G45105	5,2085	5,6051	-0,3966	2,492	0	erniedrigt
DR381543	4,4738	4,8291	-0,3553	2,266	0	erniedrigt
AT5G38005	5,2850	5,6310	-0,3460	2,218	0	erniedrigt
AT1G53635	4,8820	5,1989	-0,3169	2,074	0	erniedrigt

Ein negativer log Ratio Wert zeigt an, dass das Gen in der Mutante bei -Fe+SA im Vergleich zum WT bei -Fe+SA Bedingungen herunterreguliert ist, ein positiver zeigt an, dass das Gen in der Mutante bei -Fe+SA stärker exprimiert ist als bei -Fe+SA im WT. Es wurden nur Gene mit einem P-Wert < 0,05 und einem fold change > 2 in die Liste aufgenommen.

10. Referenzen

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B. J., Daniels, M. J., & Parker, J. E. (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 95(17), 10306-11.
- Adams, E., & Turner, J. (2010). COI1, a jasmonate receptor, is involved in ethylene-induced inhibition of Arabidopsis root growth in the light. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4373-86.
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E., & Quail, P. H. (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular cell*, 23(3), 439-46.
- Assunção, A. G. L., Schat, H., & Aarts, M. G. M. (2010). Regulation of the adaptation to zinc deficiency in plants. *Plant signaling & behavior*, 5(12), 1553-1555.
- Babiychuk, E., Kushnir, S., Belles-boix, E., & Montagu, M. V. (1995). Arabidopsis thaliana NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. *Biochemistry*, 270(44), 26224-26231.
- Baldwin, I. T. (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 95(14), 8113-8.
- Balk, J., & Lobréaux, S. (2005). Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in plant science*, 10(7), 324-31.
- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J., & Vert, G. (2011). Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 1, 1-9.
- Bauer, & Blondet. (2011). Transcriptome analysis of ein3 eil1 mutants in response to iron deficiency. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1669-1671.
- Bauer, P., Berezky, Z., Brumbarova, T., Klatter, M., & Wang, H. Y. (2004). Molecular regulation of iron uptake in the dicot species *Lycopersicon esculentum* and *Arabidopsis thaliana*. *Soil science and plant nutrition*, 50(7), 997-1001.

Referenzen

- Bauer, P., Ling, H.-Q., & Guerinot, M. L. (2007). FIT, the FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR in Arabidopsis. *Plant physiology and biochemistry / Société française de physiologie végétale*, 45(5), 260-1.
- Beckers, G. J. M., & Spoel, S. H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 8(1), 1-10.
- Bläsing, O. E., Morcuende, R., Osuna, D., Ho, M., & Thimm, O. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *The plant cell*, 17(12), 3257-3281.
- Bonasera, V., Alberti, S., & Sacchetti, A. (2007). Protocol for high-sensitivity/long linear-range spectrofluorimetric DNA quantification using ethidium bromide. *BioTechniques*, 43(2), 173-176.
- Boughammoura, A., Franza, T., Dellagi, A., Roux, C., Matzanke-Markstein, B., & Expert, D. (2007). Ferritins, bacterial virulence and plant defence. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 20(3-4), 347-53.
- Briat, J.-F., Ravet, K., Arnaud, N., Duc, C., Boucherez, J., Touraine, B., Cellier, F., (2010). New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of botany*, 105(5), 811-22.
- Browse, J. (2009). The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1539-46.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P. O., Nam, H. G., Lin, J.-F., (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 42(4), 567-85.
- Buckhout, T. J., Yang, T. J. W., & Schmidt, W. (2009). Early iron-deficiency-induced transcriptional changes in Arabidopsis roots as revealed by microarray analyses. *BMC genomics*, 10, 147.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1), 57-63.
- Charron, J.-B. F., Ouellet, F., Houde, M., & Sarhan, F. (2008b). The plant apolipoprotein D ortholog protects Arabidopsis against oxidative stress. *BMC plant biology*, 8(1), 86.
- Chen, F., D'Auria, J. C., Tholl, D., Ross, J. R., Gershenzon, J., Noel, J. P., & Pichersky, E. (2003). An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis,

Referenzen

- identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *The plant journal*, 36(5), 577-588.
- Chen, W. W., Yang, J. L., Qin, C., Jin, C. W., Mo, J. H., Ye, T., & Zheng, S. J. (2010). Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in Arabidopsis. *Plant physiology*, 154(2), 810-9.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-71.
- Chini, A., Boter, M., & Solano, R. (2009). Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. *The FEBS journal*, 276(17), 4682-92.
- Chung, H. S., Niu, Y., Browse, J., & Howe, G. (2009). Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1547-59.
- Ciehanover, A., Hod, Y., & Rershol, A. (1978). 8,1978. *Biochemical and biophysical research communications*, 81(4), 1100-1105.
- Clough, S. J., & Bent, F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 16(6), 735-43.
- Colangelo, E. P., & Guerinot, M. L. (2004). The essential basic Helix-Loop-Helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *In Situ*, 16(12), 3400-3412.
- Connolly, E. L., Campbell, N. H., Grotz, N., Prichard, C. L., & Guerinot, M. L. (2003). Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant physiology*, 133(3), 1102-1110.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F., & Walker, E. L. (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, 409(6818), 346-349.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., et al. (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of botany*, 103(1), 1-11.
- Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology*, 133(10), 462-469.

Referenzen

- Dalchau, N., Baek, S. J., Briggs, H. M., Robertson, F. C., Dodd, A. N., Gardner, M. J., Stancombe, M. (2011). The circadian oscillator gene GIGANTEA mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 108(12), 5104-9.
- Dathe, W., Rönch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., & Schreiber, K. (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta*, 153(6), 530-535.
- De Vos, M., Van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelius, J. P., Dicke, M., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2006). Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 142(1), 352-63.
- Desbrosses-Fonrouge, A.-G., Voigt, K., Schröder, A., Arrivault, S., Thomine, S., & Krämer, U. (2005). *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Letters*, 579(19), 4165-4174.
- Ding, Z., Millar, A. J., Davis, A. M., & Davis, S. J. (2007). TIME FOR COFFEE encodes a nuclear regulator in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *The plant cell*, 19(5), 1522-36.
- Dinnyen, J. R., Long, T. a, Wang, J. Y., Jung, J. W., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., (2008). Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5878), 942-5.
- Doan, T. T. P., Domergue, F., Fournier, A. E., Vishwanath, S. J., Rowland, O., Moreau, P., Wood, C. C., (2011). Biochemical characterization of a chloroplast localized fatty acid reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et biophysica acta*.
- Doares, S. H., Narvaez-Vasquez, J., Conconi, a., & Ryan, C. a. (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant physiology*, 108(4), 1741-1746.
- Doherty, H., Selvendran, R., & Bowles, D. (1988). The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological and molecular plant pathology*, 33(3), 377-384.
- Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*, 1(4), 316-323.
- Duc, C., Cellier, F., Lobréaux, S., Briat, J.-F., & Gaymard, F. (2009). Regulation of iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by the clock regulator time for coffee. *The journal of biological chemistry*, 284(52), 36271-81.
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology*, 42, 185-209.

Referenzen

- Durrett, T. P., Gassmann, W., & Rogers, E. E. (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant physiology*.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., & Guerinot, M. L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 93(11), 5624-5628.
- Farmer, E. E., Alméras, E., & Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 372-8.
- Feller, A., Machemer, K., Braun, E. L., & Grotewold, E. (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 66(1), 94-116.
- Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the chemical society, transactions*, 65, 899.
- Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., & Ausubel, F. M. (2003). Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *The plant journal*, 35(2), 193-205.
- Ferre-D'Amare, A., Pognonec, P., Roeder, R., & Burley, S. (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *The EMBO journal*, 13(1), 180.
- Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., & Turner, J. G. (1994). Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *The plant cell*, 6(5), 751-759.
- Fonseca, S., Chico, J. M., & Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 539-47.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., et al. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature chemical biology*, 5(5), 344-50.
- Franklin, K., Larner, V. S., & Whitelam, G. C. (2005). The signal transducing photoreceptors of plants. *The international journal of developmental biology*, 49(5-6), 653-64.
- Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, a, & Ryals, J. (1995). Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant molecular biology*, 29(5), 959-68.

Referenzen

- García, M. J., Lucena, C., Romera, F. J., Alcántara, E., & Pérez-Vicente, R. (2010). Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, *61*(14), 3885-99.
- García, M. J., Suárez, V., Romera, F. J., Alcántara, E., & Pérez-Vicente, R. (2011). A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, *49*(5), 537-44.
- Gepstein, S. (2004). Leaf senescence--not just a "wear and tear" phenomenon. *Genome biology*, *5*(3), 212.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, *43*, 205-27.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Métraux, J.-P., Zhu, T., (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The plant journal: for cell and molecular biology*, *34*(2), 217-28.
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current opinion in plant biology*, *9*(4), 414-20.
- Grbic, V., & Bleeker, A. B. (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The plant journal*, *8*(4), 595-602.
- Green, L. S., & Rogers, E. E. (2004). FRD3 Controls Iron Localization in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *136*, 2523-2531.
- Grusak, M., Welch, R. M., & Kochian, L. V. (1990). Physiological characterization of a single-gene mutant of *Pisum sativum* exhibiting excess iron accumulation. *Plant physiology*, *93*(3), 976-81.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G., & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of plant physiology*, *164*(6), 728-36.
- Guo, D., Wong, W. S., Xu, W. Z., Sun, F. F., Qing, D. J., & Li, N. (2011). Cis-cinnamic acid-enhanced 1 gene plays a role in regulation of *Arabidopsis* bolting. *Plant molecular biology*, *75*(4-5), 481-95.
- Guo, X.-H., Lv, Y.-D., Jiang, J., Li, H.-Y., & Liu, G.-F.. (2012). Expression, purification and characterization of a peroxidase from *Tamarix hispida*. *African journal of biotechnology*, *11*(7), 1540-1544.

Referenzen

- Gupta, N. C., Jain, P. K., Bhat, S. R., & Srinivasan, R. (2011). Upstream sequence of fatty acyl-CoA reductase (FAR6) of *Arabidopsis thaliana* drives wound-inducible and stem-specific expression. *Plant cell reports*, 31(5), 839-50.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Oostendorp, M., (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The plant cell*, 8(4), 629-43.
- Halim, V., Vess, A., Scheel, D., & Rosahl, S. (2006). The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 8(3), 307-13.
- Hanfrey, C., Fife, M., & Buchanan-Wollaston, V. (1996). Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant molecular biology*, 30(3), 597-609.
- Haydon, M. J., Bell, L. J., & Webb, A. (2011). Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *Journal of experimental botany*, 62(7), 2333-48.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F., & Gan, S. (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence 1. *American society of plant physiologists*, 128(March), 876-884.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular biology and evolution*, 20(5), 735-747.
- Hell, R., & Stephan, U. W. (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 216(4), 541-551.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67, 425-79.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H. T., Mattsson, O., Jørgensen, L. B., (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell*, 137(4), 773-83.
- Hudson, D., Guevara, D., Yaish, M. W., Hannam, C., Long, N., Clarke, J. D., Bi, Y.-M., et al. (2011). GNC and CGA1 modulate chlorophyll biosynthesis and glutamate synthase (GLU1/Fd-GOGAT) expression in *Arabidopsis*. (H. Yang, Ed.) *PLoS ONE*, 6(11).
- Hwang, I. S., & Hwang, B. K. (2011). The pepper mannose-binding lectin gene CaMBL1 is required to regulate cell death and defense responses to microbial pathogens. *Plant physiology*, 155(1), 447-63.

Referenzen

- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., (2006). Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant journal*, 45(3), 335-346.
- Ivanov, R., Brumbarova, T., & Bauer, P. (2011). Fitting into the harsh reality: Regulation of iron- deficiency responses in dicotyledonous plants. *Molecular plant*, (5), 1-16.
- Jakoby, M., Wang, H.-Y., Reidt, W., Weisshaar, B., & Bauer, P. (2004). FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 577(3), 528-534.
- Johnson, C., Boden, E., & Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans- activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 15(8), 1846-1858.
- Jones, S. (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology*, 5(6), 226.
- Kang, H. G., & Singh, K. B. (2000). Characterization of salicylic acid-responsive, arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 21(4), 329-39.
- Kang, H.-G., Foley, R. C., Oñate-Sánchez, L., Lin, C., & Singh, K. B. (2003a). Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *The plant Journal*, 35(3), 362-372.
- Karimi, M., Depicker, A., & Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant physiology*, 145(4), 1144-54.
- Khanna, R., Kronmiller, B., Maszle, D. R., Coupland, G., Holm, M., Mizuno, T., & Wu, S.-H. (2009). The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *The plant cell*, 21(11), 3416-20.
- Kim, S. A., Punshon, T., Lanzirrotti, A., Li, L., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kaplan, J., et al. (2006). Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science*, 314(5803), 1295-1298.
- Klatte, Marco, Schuler, M., Wirtz, M., Fink-Straube, C., Hell, R., & Bauer, P. (2009). The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant physiology*, 150(1), 257-71.
- Klatte, Marco, & Bauer, P. (2008). Accurate real-time reverse transcription quantitative PCR. In T. Pfannschmidt (Ed.), (Vol. 479). Humana Press.

Referenzen

- Ko, J.-H., Kim, J. H., Jayanty, S. S., Howe, G. a., & Han, K.-H. (2006). Loss of function of COBRA, a determinant of oriented cell expansion, invokes cellular defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, *57*(12), 2923-36.
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M. H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T., & Maeshima, M. (2004). Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant and cell physiology*, *45*(12), 1749-1758.
- Kobayashi, T., Itai, R. N., Ogo, Y., Kakei, Y., Nakanishi, H., Takahashi, M., & Nishizawa, N. K. (2009). The rice transcription factor IDEF1 is essential for the early response to iron deficiency, and induces vegetative expression of late embryogenesis abundant genes. *The plant journal: for cell and molecular biology*, *60*(6), 948-61.
- Kobayashi, T., Nakayama, Y., & Takahashi, M. (2004). Construction of artificial promoters highly responsive to iron deficiency. *Soil science and plant nutrition, japanese society of soil science and plant nutrition*. *50*(7), 1167-1175
- Kobayashi, T., Nakayama, Y., Itai, R. N., Nakanishi, H., Yoshihara, T., Mori, S., & 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. *The plant journal*, *36*(6), 780-793.
- Kobayashi, T., Ogo, Y., Itai, R. N., Nakanishi, H., Takahashi, M., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2007). The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, *104*(48), 19150-5.
- Koornneef, A., & Pieterse, C. M. J. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant physiology*, *146*(3), 839-44.
- Korshunova, Y. O., Eide, D., Clark, W. G., Guerinot, M. L., & Pakrasi, H. B. (1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant molecular biology*, *40*(1), 37-44.
- Kus, J. V., Zaton, K., Sarkar, R., & Cameron, R. K. (2002). Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *The plant cell*, *14*(February), 479-490.
- Lampard, G. R., Macalister, C. A., & Bergmann, D. C. (2008). Is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *In Vitro*, *322*(11), 1113-1116.

Referenzen

- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo H. and Thomine, S., (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal*, 24(23), 4041-4051.
- Larkindale, J., & Knight, M. R. (2002). Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *The plant cell*, 128(2), 682-695.
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R., & Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant physiology*, 138(2), 882-97.
- Lau, O. S., & Deng, X. W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current opinion in plant biology*, 13(5), 571-7.
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 10(1), 71-82.
- Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Körbes, A. P., Memelink, J., Pieterse, C. M. J., (2010). Ethylene signaling renders the jasmonate response of Arabidopsis insensitive to future suppression by salicylic acid. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 23(2), 187-97.
- Leon-Reyes, A., Spoel, S. H., De Lange, E. S., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., Millenaar, F. F., et al. (2009). Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant physiology*, 149(4), 1797-809.
- Levesque-Tremblay, G., Havaux, M., & Ouellet, F. (2009). The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects Arabidopsis against oxidative stress. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 60(4), 691-702.
- Li, J., (2004). The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The plant cell*, 16(2), 319-331.
- Li, L., He, Z., Pandey, G. K., Tsuchiya, T., & Luan, S. (2002). Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *The journal of biological chemistry*, 277(7), 5360-8.
- Ling, H Q, Bauer, P., Berezky, Z., Keller, B., & Ganai, M. (2002). The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 99(21), 13938-13943.

Referenzen

- Lingam, S., Mohrbacher, J., Brumbarova, T., Potuschak, T., Fink-Straube, C., Blondet, E., Genschik, P., et al. (2011). Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in Arabidopsis. *The plant cell*, 23(5), 1815-29.
- Liu, C., Zhang, L., Sun, J., Luo, Y., Wang, M.-bo, Fan, Y.-liu, & Wang, L. (2009). The artificial microRNA mediates GUS-GFP gene silencing using ath-miR169d precursor as backbone. *Life science journal*, 6(3), 86-94.
- Liu, G., Greenshields, D. L., Sammynaiken, R., Hirji, R. N., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2007). Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of cell science*, 120(Pt 4), 596-605.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), 2053-6.
- Lohmeier-Vogel, E. M., Kerk, D., Nimick, M., Wrobel, S., Vickerman, L., Muench, D. G., & Moorhead, G. B. G. (2008). Arabidopsis At5g39790 encodes a chloroplast-localized, carbohydrate-binding, coiled-coil domain-containing putative scaffold protein. *BMC plant biology*, 8, 120.
- Long, T. a, Tsukagoshi, H., Busch, W., Lahner, B., Salt, D. E., & Benfey, P. N. (2010). The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *The plant cell*, 22(7), 2219-36. doi:10.1105/tpc.110.074096
- Lu, H. (2009). Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 713-7.
- Lucena, C., Waters, B. M., Romera, F. J., García, M. J., Morales, M., Alcántara, E., & Pérez-Vicente, R. (2006). Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H⁺-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. *Journal of experimental botany*, 57(15), 4145-54.
- Ma, P. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: Perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, 77(3), 451-459.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., & Raskin, I. (1990). Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4983), 1002-4.
- Manfield, I. W., Devlin, P. F., Jen, C.-H., Westhead, D. R., & Gilmartin, P. M. (2007). Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the Arabidopsis GATA gene family. *Plant physiology*, 143(2), 941-58.

Referenzen

- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (2nd ed., p. Volume: 239, Issue: 1, Publisher: Academic Press,). Academic Press.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., & Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual review of plant biology*, 54, 23-61.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K., & Takahashi, H. (2006). Arabidopsis SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *The plant cell*, 18(11), 3235-51.
- Maurer, F., Müller, S., & Bauer, P. (2011). Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, 49(5), 530-6.
- McWatters, H. G., & Devlin, P. F. (2011). Timing in plants--a rhythmic arrangement. *FEBS letters*, 585(10), 1474-84. Federation of European Biochemical Societies.
- Meiser, J., Lingam, S., & Bauer, P. (2011). Post-translational regulation of the Fe deficiency bHLH transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide. *Plant physiology*, (49).
- Metraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., et al. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in Cucumber. *Science*, 250(8), 1004-6.
- Millar, A. J. (2004). Input signals to the plant circadian clock. *Journal of experimental botany*, 55(395), 277-83.
- Miura, K., & Ohta, M. (2010). SIZ1, a small ubiquitin-related modifier ligase, controls cold signaling through regulation of salicylic acid accumulation. *Journal of plant physiology*, 167(7), 555-60.
- Monte, E., Tepperman, J. M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K. a, Alonso, J. M., Ecker, J. R., Li, X., (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 101(46), 16091-8.
- Mori, S. (1999). Iron acquisition by plants. *Current opinion in plant biology*, 2(3), 250-253.
- Morris, K., MacKerness, S. a, Page, T., John, C. F., Murphy, a M., Carr, J. P., & Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 23(5), 677-85.

Referenzen

- Mowla, S. B., Cuypers, A., Driscoll, S. P., Kiddle, G., Thomson, J., Foyer, C. H., & Theodoulou, F. L. (2006). Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *The plant journal: for cell and molecular biology*, *48*(5), 743-56.
- Murgia, I., Tarantino, D., Soave, C., & Morandini, P. (2011). *Arabidopsis* CYP82C4 expression is dependent on Fe availability and circadian rhythm, and correlates with genes involved in the early Fe deficiency response. *Journal of plant physiology*, *168*(9), 894-902.
- Murgia, I., Vazzola, V., Tarantino, D., Cellier, F., Ravet, K., Briat, J.-F., & Soave, C. (2007). Knock-out of ferritin *AtFer1* causes earlier onset of age-dependent leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, *45*(12), 898-907.
- Murre, C., McCaw, P. S., & Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, *56*(5), 777-783.
- Más, P., (2005). Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *The international journal of developmental biology*, *49*(5-6), 491-500.
- Nath, U., Crawford, B. C. W., Carpenter, R., & Coen, E. (2003). Genetic control of surface curvature. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5611), 1404-7.
- Nawrath, C., & Métraux, J. P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The plant cell*, *11*(8), 1393-404.
- Ogo, Y., Itai, R. N., Nakanishi, H., Kobayashi, T., Takahashi, M., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2007). The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *Plant Journal*.
- Oh, S. a, Park, J. H., Lee, G. I., Paek, K. H., Park, S. K., & Nam, H. G. (1997). Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *12*(3), 527-35.
- Orozco-ca, M. L., & Ryan, C. A. (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants 1. *Society*, *130*(September), 487-493.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, *425*(6955), 257-63.
- Palmgren, M. G. (2001). PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, *52*, 817-845.

Referenzen

- Parker, J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk, A., Gunn, N. D., & Daniels, M. J. (1996). Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to Peronospora parasitica specified by several different RPP genes. *The plant cell*, 8(11), 2033-46.
- Pena-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E., & Willmitzer, L. (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta*, 191(1).
- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Métraux, J. P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *The plant cell*, 10(12), 2103-13.
- Petit, J. M., Briat, J. F., & Lobréaux, S. (2001). Structure and differential expression of the four members of the Arabidopsis thaliana ferritin gene family. *The biochemical journal*, 359(Pt 3), 575-82.
- Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 456-64.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308-16.
- Pires, N., & Dolan, L. (2010a). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Molecular biology and evolution*, (July), 911-912.
- Pires, N., & Dolan, L. (2010b). Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular biology and evolution*, 27(4), 862-74.
- Pozo, M. J., Van Der Ent, S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana. *The new phytologist*, 180(2), 511-23.
- Quirino, B. F., Noh, Y. S., Himelblau, E., & Amasino, R. M. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in plant science*, 5(7), 278-82.
- Raynal, M., Guillemot, J., Gueguen, C., Cooke, R., Delseny, M., & Gruber, V. (1999). Structure, organization and expression of two closely related novel Lea (late-embryogenesis-abundant) genes in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, 40(1), 153-65.
- Reymond, P., & Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology*, 1(5), 404-11.

Referenzen

- Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, 62(10), 3321-38.
- Roberts, L. A., Pierson, A. J., Panaviene, Z., & Walker, E. L. (2004). Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiology*, 135(1), 112-120.
- Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L., & Guerinot, M. L. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 397(6721), 694-697.
- Rogers, E. E., & Guerinot, M. L. (2002). FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in Arabidopsis. *The plant cell*, 14(8), 1787-1799.
- Romera, F. (1999). Ethylene production by Fe-deficient roots and its involvement in the regulation of Fe-deficiency stress responses by strategy I plants. *Annals of botany*, 83(1), 51-55.
- Romera, F. & Alcantara, E. (1994). Iron-Deficiency stress responses in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots (A Possible Role for Ethylene?). *Plant physiology*, 105(4), 1133-1138.
- Rouhier, N., Couturier, J., & Jacquot, J.-P. (2006). Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1685-96.
- Rouhier, N., Lemaire, S. D., & Jacquot, J.-P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual review of plant biology*, 59, 143-66.
- Ruckle, M. E., Burgoon, L. D., Lawrence, L. a, Sinkler, C. a, & Larkin, R. M. (2012). Plastids are major regulators of light signaling in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology*, 159(May), 366-390.
- Ryals, J., Lawton, K. A., Delaney, T. P., Friedrich, L., Kessmann, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., et al. (1995). Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 92(10), 4202-5.
- Römheld, V., & Marschner, H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant physiology*, 80(1), 175-180.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, A., Shin, J., & Davis, S. J. (2011). Abiotic stress and the plant circadian clock. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 223-231.

Referenzen

- Santi, S., & Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *The new phytologist*, 183(4), 1072-84.
- Schaaf, G., Ludewig, U., Erenoglu, B. E., Mori, S., Kitahara, T., & von Wiren, N. (2004). ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *Journal of biological chemistry*, 279(10), 9091-9096.
- Schikora, A. & Schmidt, W. (2001). Acclimative changes in root epidermal cell fate in response to Fe and P deficiency: a specific role for auxin? *Protoplasma*, 218(1-2), 67-75.
- Schindelman, G., Desalle, R., & Benfey, P. N. (2002). The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in Arabidopsis . A new fellowship in expansion. *Plant physiology*, 130(10), 538-548.
- Schmidt, W., Tittel, J., & Schikora, a. (2000). Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *Plant physiology*, 122(4), 1109-18.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The plant cell*, 18(May), 1121-1133.
- Seckback, J., (1982). Ferreting out the secrets of plant ferritin - A review. *Journal of plant nutrition*, 5(4-7), 369-394.
- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 365-71.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 459-64.
- Shen, Y., Khanna, R., Carle, C. M., & Quail, P. H. (2007). Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant physiology*, 145(3), 1043-51.
- Shimizu, T., Toumoto, a, Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y., (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *The EMBO journal*, 16(15), 4689-97.
- Shulaev, V., Silverman, P., & Raskin, I., (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385(6618), 718-721.
- Sivitz, A., Grinvalds, C., Barberon, M., Curie, C., & Vert, G. (2011). Proteasome-mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses. *The plant journal: for cell and molecular biology*, 66(6), 1044-52.

Referenzen

- Spoel, S. H., & Dong, X., (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell host & microbe*, 3(6), 348-51.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Pelt, J. A. V., Mueller, M. J., Buchala, A. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The plant cell*, 15(3), 760-770.
- Stacey, M. G., Koh, S., Becker, J., & Stacey, G. (2002). AtOPT3 , a member of the oligopeptide transporter family , is essential for embryo development in Arabidopsis. *Society*, 14(11), 2799-2811.
- Stacey, M. G., Patel, A., McClain, W. E., Mathieu, M., Remley, M., Rogers, E. E., Gassmann, W., (2008). The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant physiology*, 146(2), 589-601.
- Staswick, P E, Su, W., & Howell, S. H. (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 89(15), 6837-40.
- Staswick, P. E., Huang, J. F., & Rhee, Y. (1991). Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant physiology*, 96(1), 130-6.
- Staswick, P. E., & Tiriyaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The plant cell*, 16(8), 2117-2127.
- Staswick, P.E, Tiriyaki, I., & Rowe, M. L. (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic , and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The plant cell*, 14(6), 1405-1415.
- Takagi, S.-I.. (1976). Naturally occurring iron-chelating compounds. in oat- and rice-root washing. I. Activity measurement and. preliminary characterization. *Soil science and plant nutrition*, 22(4), 423-433.
- Takagi, S.-ichi, Nomoto, K., & Takemoto, T. (1984). Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of plant nutrition*, 7(1), 469-477.
- Terry, N., & Abadia, J. (1986). Function of iron in chloroplasts. *Journal of plant nutrition*, 9(3), 609-646.

Referenzen

- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., et al. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 661-5.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J. I., & Barbier-Brygoo, H. (2003). AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, *34*(5), 685-95.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic / Helix-Loop-Helix transcription factor family. *Plant physiology*, *15*(8), 1749-1770.
- Tsutsui, T., Kato, W., Asada, Y., Sako, K., Sato, T., Sonoda, Y., Kidokoro, S., et al. (2009). DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in Arabidopsis. *Journal of plant research*, *122*(6), 633-43.
- Ulker, B., Shahid Mukhtar, M., & Somssich, I. E. (2007). The WRKY70 transcription factor of Arabidopsis influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta*, *226*(1), 125-37.
- Van Loon, L. C., & Van Strien. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 85-97.
- Vert, G. A., Briat, J. F., & Curie, C. (2003). Dual regulation of the Arabidopsis high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant physiology*, *132*(2), 796-804.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. L., Briat, J. F., & Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The plant cell*, *14*(6), 1223-1233.
- Vorwieger, A., Gryczka, C., Czihal, A., Douchkov, D., Tiedemann, J., Mock, H.-P., Jakoby, M. (2007). Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants. *Planta*, *226*(1), 147-58.
- Wang, H.-Y., Klatter, M., Jakoby, M., Bäumlein, H., Weisshaar, B., & Bauer, P. (2007). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in Arabidopsis thaliana. *Planta*, *226*(4), 897-908.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The plant cell*, *3*(10), 1085-1094.
- Ward, J. M., Cufir, C. A., Denzel, M. A., & Neff, M. M. (2005). The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in Arabidopsis. *The plant cell*, *17*(2), 475-485.

Referenzen

- Warthmann, N., Chen, H., Ossowski, S., Weigel, D., & Hervé, P. (2008). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PloS one*, 3(3), e1829.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*, 100(4), 681-97.
- Waters, B. M., & 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*. *New phytologist*.
- Waters, B. M., Lucena, C., Romera, F. J., Jester, G. G., Wynn, A. N., Rojas, C. L., Alcantara, E., et al. (2007). Ethylene involvement in the regulation of the H(+)-ATPase *CsHA1* gene and of the new isolated ferric reductase *CsFRO1* and iron transporter *CsIRT1* genes in cucumber plants. *Plant physiology and biochemistry*, 45(5), 293-301.
- Wiermer, M., Feys, B. J., & Parker, J. E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 383-9.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-5.
- Ogo, Y., Toki, S., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2008). A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. *Journal of biological chemistry*, 283(19), 13407-13417.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., et al. (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The plant cell*, 21(8), 2220-36.
- Yanagisawa, S. (2004). Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant & cell physiology*, 45(4), 386-91.
- Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I., & Watanabe, A. (2001). Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology*, 42(2), 170-8.
- Yuan, Y. X., Zhang, J., Wang, D. W., & Ling, H. Q. (2005). *AtbHLH29* of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. *Cell research*, 15(8), 613-621.
- Yuan, Y., Wu, H., Wang, N., Li, J., Zhao, W., Du, J., Wang, D., & Ling, H.-Q. (2008). FIT interacts with *AtbHLH38* and *AtbHLH39* in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Cell research*, 18(3), 385-97.

Referenzen

- Zhang, J., Zhu, H.-fen, Liang, H., Liu, K.-fan, Zhang, A.-min, Ling, H.-qing, & Wang, D.-wen. (2006). Further analysis of the function of AtBHLH29 in regulating the iron uptake process in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of integrative plant biology*, 48(1), 75-84.
- Zhang, Yaxi, Yang, Y., Fang, B., Gannon, P., Ding, P., Li, X., & Zhang, Y. (2010). *Arabidopsis snc2-1D* activates receptor-like protein-mediated immunity transduced through WRKY70. *The plant cell*, 22(9), 3153-63.
- Zheng, L., Ying, Y., Wang, L., Wang, F., Whelan, J., & Shou, H. (2010). Identification of a novel iron regulated basic helix-loop-helix protein involved in Fe homeostasis in *Oryza sativa*. *BMC plant biology*, 10, 166.
- Zhu, C., Gan, L., Shen, Z., & Xia, K. (2006). Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 57(6), 1299-308.
- von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R. (1999). Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant physiology*, 119(3), 1107-14.

11. Danksagung

Eine Danksagung für ein Projekt zu schreiben, dass viele Leute viel Zeit, Nerven, Mühe und auch Geld gekostet hat, ist nicht ganz einfach. Wem soll man anfangen zu danken und wo sollte man aufhören? Mir erscheint es am einfachsten bei meinem Arbeitsumfeld zu beginnen und mich in den privaten Bereich vorzuarbeiten.

Zuerst möchte ich meiner Professorin Dr. Petra Bauer danken, die mir überhaupt die Möglichkeit einer Promotionsstelle eingeräumt hat. Danke für alles, ich habe viele sehr wichtige Lektionen von dir gelernt. Danke an Prof. Dr. Claus-Michael Lehr, Prof. Dr. Ulrich Schäfer und besonders Dr. Nicole Daum, die mein Projekt in der Pharmazie mit vollem Einsatz unterstützt haben. Danke an Tzvetina und Rumen für eure fachliche Kompetenz und eure warmherzige, offene und soziale Art, die ich über alles zu schätzen weiß. Danke an Moni, dass du den Laden am Laufen hältst. Danke auch an Angelika, für deine Hilfe im Labor und deine positive Ausstrahlung. Vielen Dank Christine, unsere Gespräche habe ich stets sehr genossen. Thanks, Cham and Siva for your help and friendship. Mara und Johnny, hier ist kein Raum aufzuzählen warum die Zeit mit euch zusammen für mich besonders wertvoll war, nur so viel - das war legendär! Danke dafür.

Danke an meine Familie für euren Rückhalt, eure Liebe und das in mich gesetzte Vertrauen! Danke an meinen gesamten Freundeskreis für die vielen lustigen Donnerstage. Auch zu Dank verpflichtet bin ich für das 6-wöchige Asyl im ackermannischen Haushalt und auch danke an meinen langjährigen Praktikumpartner Hyh-nah Poh.

Zuletzt danke an meine Frau Christine - für alles.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Felix Maurer
Geburtstag und -ort	28.11.1977 in Saarbrücken
Nationalität	Deutsch
Familienstatus	verheiratet

Schulbildung

07/1988 bis 04/1998	Ludwigsgymnasium Saarbrücken
Erworbene Qualifikation	Abitur

Zivildienst

10/1998 bis 10/1999	Kindertagesstätte am Ordensgut
---------------------	--------------------------------

Studium

10/1999 bis 1/2008	Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes mit Schwerpunkt Human und Molekularbiologie
Erworbener Titel	Diplom-Biologe

Promotion

03/2008 bis 11/2012	Promotion am Institut der Molekularen Pflanzenbiologie an der Universität des Saarlandes mit abschließender Verteidigung im November 2012
	wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Petra Bauer
	Titel der Dissertation: Eisenmangelinduzierbare bHLH Transkriptionsfaktoren der Untergruppe Ib(2) in der Eisenhomöostase von <i>Arabidopsis thaliana</i> und im Kontext hormoneller Signale

13. Publikationsliste

Felix Maurer, Nicole Daum, Ulrich F. Schaefer, Claus-Michael Lehr und Petra Bauer, 2010.

Plant genetic factors for iron homeostasis affect iron bioavailability in Caco-2 cells. Food Research international

Felix Maurer, Sabine Müller und Petra Bauer, 2011.

Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. Plant Physiology and Biochemistry

Felix Maurer, Maria Augusta Naranjo Arcos und Petra Bauer (in preparation)

A triple mutant defective in three iron deficiency-induced BASIC HELIX-LOOP-HELIX genes of the subgroup Ib(2) is sensitive to iron deficiency and salicylic acid in *Arabidopsis thaliana*

Persönliche Präsentationen auf Konferenzen

6th TriNational Arabidopsis Meeting, September 2009, Köln, Deutschland. **Felix Maurer**, Anna Kühn und Petra Bauer. The role of Salicylic acid and Jasmonate network in *A. thaliana* in respect to iron homeostasis (Poster)

15th International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants, Juni 2010, Budapest, Ungarn, **Felix Maurer**, Nicole Daum, Ulrich F. Schaefer, Claus-Michael Lehr und Petra Bauer. Plant genetic factors for iron homeostasis affect iron bioavailability in Caco-2 cells (Poster)