Identifizierung und Charakterisierung schwermetallregulierter Gene im Metallophyten *Arabidopsis halleri* (L.) und in *Arabidopsis thaliana* (L.).

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Christoph Veß
geb. am 13.09.1972 in Baden-Baden

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Scheel

2. Prof. Dr. K. Humbeck

3. Prof. Dr. K.-J. Dietz

Halle (Saale), 18.03.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006714
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006714]

1 Einleitung 1
1.1 Schwermetalltoxizität, Schwermetalltoleranz, Schwermetallhyperakkumulation und Schwermetallhomöostase 2
1.2 Mobilisierung von Schwermetallen 5
1.3 Aufnahme von Schwermetallen in die Zelle 5
1.4 Chelierung der Schwermetallionen 7
1.5 Export und intrazelluläre Verteilung der Schwermetalle 10
1.6 Regulationsmechanismen und Signaltransduktionswege als Antwort auf Stressfaktoren 11
1.6.1 Perzeption von Stresssignalen 12
1.6.2 Intrazelluläre sekundäre Botenstoffe 13
1.6.3 Weiterleitung über Signaltransduktionskaskaden 15
1.6.4 Transkriptionelle Aktivierung von stressresponsiven Genen 16
1.7 Mechanismen der Schwermetalltoleranz und Schwermetallhyperakkumulation 17
1.8 *Arabidopsis halleri* als Modellsysteme zur Untersuchung der Schwermetalltoleranz und Schwermetallhomöostase 18
1.9 Anliegen der Arbeit 18

2 Material und Methoden 20
2.1 Material 20
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide 20
2.1.2 Medien 20
2.1.3 Vektor-Plasmide und Bakterienstämme 21
2.2 Kultivierung und Behandlung von Pflanzen 21
2.2.1 Pflanzenmaterial 21
2.2.2 Pflanzenanzucht 22
2.2.3 Oberflächensterilisierung von Samen 22
2.2.4 Stressbehandlung der Pflanzen 22
2.2.5 Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* 23
2.3 Bakterien 23
2.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli* 23
2.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen 23
2.3.1.2 Transformation von *E. coli* 23
2.3.2 Kultivierung von *A. tumefaciens* 23
2.3.2.1 Transformation von *A. tumefaciens* 24
2.4 Nukleinsäureanalytik und Herstellung rekombinanter DNA 24
2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA 24
2.4.2 DNA-Isolierung 24
2.4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen 24
2.4.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA 25
2.4.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 25

2.5 FRDD-Experiment 25
2.6 cDNA-AFLP-Experiment 26
2.7 Agarose-Gelelektrophorese 28
2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten 28
2.7.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese 29
2.8 Transfertechniken und radioaktive Hybridisierung 29
2.8.1 Northern Transfer 29
2.8.2 Southern Transfer 29
2.8.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten 29
2.8.4 Radioaktive Hybridisierung 29
2.9 PCR 30
2.10 RT-PCR 30
2.11 RACE-Reaktion 30
2.12 DNA-Sequenzierung 30
2.12.1 Automatisierte Sequenzierung 30
2.12.2 Computergestützte Sequenzanalyse 31
2.13 Makroarray-Experimente 31
2.14 Mikroarray-Experimente 32
2.14.1 ABC-Transporter-Mikroarray 32
2.14.2 Affymetrix „GeneChip® Arabidopsis Genome Array“ 33
2.15 Proteinanalytische Methoden 35
2.15.1 Proteinextraktion 35
2.15.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 35
2.15.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 35
2.15.4 Western-Blot 36
2.15.5 Proteinfärbetechniken 36
2.15.5.1 Alternative Coomassiefärbung 36
2.15.5.2 Ponceau-S-Färbung 36
2.15.6 Immunodetektion von Proteinen 36
2.16 *in-Gel*-MBP-Kinasenachweis 37
2.17 Immunopräzipitation und Kinasenachweis 37
2.18 Chlorophyllbestimmung 38

3 Ergebnisse 39
3.1 Identifizierung von schwermetallresponsiven Genen in *A. halleri* 39
3.1.1 Transkriptionelle Aktivierung des Schwermetallmarkergens *GSH1* in *A. halleri* 39
3.1.2 Identifizierung schwermetallregulierter Gene in *A. halleri* 40
3.1.2.1 RFDD-Analyse 40
3.1.2.2 cDNA-AFLP-Analyse 42
3.1.3 Auswahl und Charakterisierung der Kandidatengene 46

3.1.3.1 Auswahl der Kandidatengene anhand von Sequenzhomologien zu Genen bekannter Funktion 46
3.1.3.2 Charakterisierung der Schwermetallantwort der Fragmente 10,1 und 11,2 mittels cDNA-AFLP in *A. halleri* 49
3.1.3.3 Charakterisierung der Metallantwort und oxidativen Stress von *MPK11, bZip6* und der *PP2C* mittels RT-PCR 50
3.1.3.4 Weiterführende Charakterisierung von *MPK11, bZIP6* und der *PP2C* durch die Behandlung mit biotischen und abiotischen Stressfaktoren 52
3.1.3.5 Analyse der Expression der Kandidatengene in Abhängigkeit zur eingesetzten Cu^{2+}-Konzentration 52
3.1.3.6 Analyse der schwermetallspezifischen Expression in Spross- und Wurzelgewebe 53
3.1.3.7 Charakterisierung weiterer cDNA-AFLP-Klone mittels Makroarray 54
3.1.4 Identifizierung schwermetallregulierter ABC-Transporter mittels Mikroarrays 55
3.2 Weiterführende Untersuchungen zu *AtbZIP6* 57
3.2.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten von *AtbZIP6* 58
3.2.2 Untersuchungen zum Genotyp der identifizierten T-DNA-Insertionslinien 59
3.2.3 RT-PCR-Analyse der B1-*AtbZIP6*-Pflanzen 60
3.2.4 Untersuchungen möglicher Phänotypen von *bzip6-1* 61
3.2.5 Untersuchungen zur Auswirkung der Insertion auf das Transkriptom 62
3.2.6 Herstellung verschiedener Konstrukte zur Komplementation der *bZIP6-1*-Mutante sowie zur Überexpression des *bZIP6*-Transkriptionsfaktors in *A. thaliana* 65
3.3 Weiterführende Untersuchungen zur *PP2C* (At2g30020) 66
3.3.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten der *PP2C* 66
3.3.2 Expressionsanalysen phylogenetisch verwandter PP2C 68
3.4 Untersuchungen zur posttranslationalen Aktivierung von MAP-Kinasen in *A. halleri* und *A. thaliana* nach Schwermetallbehandlung 69
3.4.1 Vergleichende Untersuchungen zur MAPK-Aktivierung in *A. halleri* und *A. thaliana* 69
3.4.2 Untersuchungen zur gewebespezifischen Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle 70
3.4.3 Untersuchung zur Abhängigkeit der MAPK-Aktivierung von der Konzentration der Cu-Ionen 72
3.5 Identifizierung der durch Schwermetalle posttranslational aktivierten MAP-Kinasen in *A. thaliana* 73
3.5.1 Immunopräzipitation von AtMPK6 73
3.5.2 Indirekter Aktivitätsnachweis von AtMPK4 mit Hilfe der *mpk4*-Mutante 73

4 Diskussion 75
4.1 Strategien zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene 75
4.2 Identifizierung schwermetallregulierter Gene in *A. halleri* mittels cDNA-AFLP ... 77
4.2.1 Reproduzierbarkeit und Intensitätsunterschiede im cDNA-AFLP-Bandenmuster ... 78

4.2.2 Untersuchung der Schwermetalltoleranz bzw. –hyperakkumulation mittels cDNA-AFLP 78
4.2.3 Sequenzhomologie zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* 79
4.3 Identifizierung von ABC-Transportern in *A. halleri* und *A. thaliana* 80
4.4 Auswahl und Charakterisierung von Kandidatengenen in *A. halleri* und *A. thaliana* 81
4.5 Charakterisierung des *bZIP6*-Transkriptionsfaktors 82
4.5.1 *AtbZIP6* wird durch Schwermetalle transkriptionell aktiviert 83
4.5.2 Phänotypische Charakterisierung der *bZIP6-1*-Mutante 84
4.6 Charakterisierung der *PP2C* 85
4.6.1 Schwermetallspezifische Regulation der *PP2C* 86
4.6.2 Phylogenetische Analyse der Proteinphosphatasen 2C aus *A. thaliana* 86
4.7 Charakterisierung der MAPK 88
4.7.1 Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung 89
4.7.2 Posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle 90
4.7.3 Charakterisierung der schwermetallspezifischen Aktivierung von MAP-Kinasen im Spross 92
4.7.4 Immunologische Charakterisierung der schwermetallresponsiven Kinasen 92
4.7.5 Die Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle ist in Pflanzen Teil eines konservierten Signaltransduktionsweges 93
4.8 Ausblick 95

5 Zusammenfassung 97

6 Literatur 98

°C	Grad Celsius
µCi	Mikrocurie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ABA	Abscisinsäure
Ac	Azetat
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5‘-Triphosphat
BAC	„Bacterial Artificial Chromosome“
Bed.	Bedingung
BLAST	„Basic Lokal Alignment Search Tool”
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
cm^2	Quadratzentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
Col-0	Columbia-0 Ökotyp von *Arabidopsis thaliana*
cRNA	komplementäre RNA
CTP	Cytidin-5‘-Triphosphat
d	Tage
dATP	2’-Deoxyadenosin 5’-Triphosphat
dCTP	2’-Deoxycytidin 5’-Triphosphat
dGTP	2’-Deoxyguanosin 5’-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2‘-Deoxy-Nucleosid-5‘-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2’-Deoxythymidin 5’-Triphosphat
dUTP	2’-Deoxyuridin 5’-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N‘,N‘-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure
EST	„Expressed Sequence Tag“
EtBr	Ethidiumbromid
FeHBED	Eisen-N,N‘-Bis-(2-Hydroxybenzoyl)-Ethylendiamin-N-N‘-diacetat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GFP	“Green Fluorescent Protein”

GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosin-5‘-Triphosphat
h	Stunden
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
Kap.	Kapitel
KLH	“Keyhole Limpet Hemocyanin”
kPa	Kilopascal
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m^2	Quadratmeter
mA	Milliampere
MBP	Myelin-assoziiertes basisches Protein
MES	Morpholinoethansulonsäure
mg	Milligramm
min	Minuten
MJa	Methylester von Jasmonsäure
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Murrashig-Skoog
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Polyvinylpyrrolidon
prim.	primär
RACE	„Rapid Amplification of cDNA Ends“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
Rubisco	Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase
s	Sekunden
SA	Salicylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	sekundär

Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylenthylendiamin
Temp.	Temperatur
TMV	Tabak Mosaikvirus
U	Unit
u. a.	unter anderem
UTP	Uridin-5‘-Triphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Mischung Volumen zu Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Mischung Gewicht zu Volumen
w/w	Mischung Gewicht zu Gewicht
WS	Wassilewskija Ökotyp von *Arabidopsis thaliana*
z. B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

Buchstabenkode für Nukeleinsäuren und Aminosäuren:

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	X		beliebige Aminosäure
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin
M	Met	Methionin			

Nukleinsäuren:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
V	nicht T
*	Stopcodon

1 Einleitung

Entscheidend für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen sind neben ausreichend Licht, CO_2 und Wasser auch die im Boden verfügbaren Nährstoffe. Als Nährstoffe werden alle Mineralien bezeichnet, die essentiell für den pflanzlichen Metabolismus sind (Marschner, 1995). Essentielle Mineralelemente können nach ihrer relativen Konzentration im Pflanzengewebe in Makroelemente und Mikroelemente sowie in nützliche Elemente eingeteilt werden (Marschner, 1995). Allerdings kann durch diese Einteilung keine Aussage über die physiologische Bedeutung der einzelnen Elemente getroffen werden. Deshalb ist es sinnvoller, die mineralischen Pflanzennährstoffe nach ihrer physiologischen und biochemischen Funktion in vier Klassen zu unterteilen (Taiz und Zeiger, 1999).

Zur ersten Klasse gehören die Elemente N und S, die die Grundlage organischer Verbindungen wie beispielsweise Aminosäuren, Nukleinsäuren, Nukleotide oder Coenzyme bilden. Zur zweiten Gruppe zählt man Nährstoffe, die der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität (B und Si) dienen sowie in Energietransferreaktionen (P) benötigt werden. In die dritte Gruppe werden alle Nährelemente eingeteilt, die als freie oder gebundene Ionen in der Zelle vorliegen und wichtige Rollen als Kofaktoren oder bei der Regulation des osmotischen Potentials spielen. Zu dieser Gruppe werden die Elemente K, Na, Mg, Ca, Mn und Cl gezählt. Die vierte Gruppe beinhaltet alle Elemente, die an Elektronentransportreaktionen (Fe, Cu, Zn, Mo und Ni) beteiligt sind. Sie sind durch eine Dichte von mehr als 5 g/cm^3 gekennzeichnet und gehören somit der Gruppe der Schwermetalle an. Viele enzymatische Reaktionen sind ohne Schwermetallionen als Kofaktoren und Stabilisatoren der Enzymstruktur undenkbar. Dabei treten die Schwermetallionen hauptsächlich mit Carboxylgruppen, Imidazolresten und SH-Gruppen der Aminosäuren in den aktiven Zentren der Proteine in Wechselwirkung oder stabilisieren reaktive Intermediate, indem sie eine korrekte Orientierung von Substrat und Enzym zueinander ermöglichen (Schellenberger, 1989).

Aufgrund seiner hohen Ladungsdichte und der damit verbundenen Fähigkeit zur Katalyse nukleophiler Reaktionen nimmt Zink eine zentrale Rolle als Metall-Kofaktor u. a. in der Alkohol-Dehydrogenase, der Carboanhydrase bzw. Carboxypeptidasen ein (Coleman, 1992). Daneben ist Zn^{2+} als Zinkfinger-Motiv Bestandteil von Transkriptionsfaktoren, DNA- und RNA-Polymerasen, ribosomalen Proteinen sowie Lipid-bindenden Proteinen (Laity *et al*., 2001).

Fe-Ionen und Cu-Ionen katalysieren Elektronentransferreaktionen u. a. in der Atmungskette oder der Photosynthese. Dabei dient Cu^+ als π-Elektronendonator und ist im Gegensatz zu Fe^{2+} in der Lage, O_2 direkt zu binden und anschließend über die Cyt-*c* Oxidase oder die Ascorbatoxidase zu H_2O zu reduzieren. Mehr als 50 % der Gesamtkupfermenge sind an im Chloroplasten lokalisiertes Plastocyanin gebunden, einer Komponente der Elektronentransportkette im Photosystem I. Weitere Cu-Enzyme wie z. B. die Superoxid-Dismutase (SOD) sind an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt. Daneben werden kupferhaltige Polyamin- und Phenoloxidasen für die Lignifizierung der Zellwand benötigt (Marschner, 1995).

1.1 Schwermetalltoxizität, Schwermetalltoleranz, Schwermetallhyperakkumulation und Schwermetallhomöostase

Neben den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen essentiellen Funktionen sind alle Schwermetalle auch nicht-essentielle Schwermetalle wie Cd, Pb oder Hg für die Pflanze ab einer bestimmten Konzentration toxisch.

So führen zu hohe, toxische Konzentrationen an Zn^{2+} u. a. zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums. Aufgrund ähnlicher Ionenradien von Zn^{2+}, Fe^{2+} und Mg^{2+} induzieren hohe Zn^{2+}-Konzentrationen Fe^{2+}- bzw. Mg^{2+}-Mangelerscheinungen wie beispielsweise Blattchlorosen (Marschner, 1995). Die toxische Wirkung beruht auf der Verdrängung von Mg^{2+} aus dem aktiven Zentrum der RUBISCO (Van Assche und Clijsters, 1986a) und einer Inhibierung des Photosystem II durch das Ersetzen von Mn^{2+} in der Thylakoidmembran (Van Assche und Clijsters, 1986b).

Primäre Angriffsstelle der Cu-Ionen in den Zellen ist die Plasmamembran. Dabei kommt es als Folge der Haber-Weiss-Reaktion (1) und der Fenton-Reaktion (2) zur Bildung von Hydroxylradikalen, die unter dem Begriff ROS („**R**eactive **O**xygen **S**pecies“) zusammengefasst werden.

(1) $O^{2-}{}_{*} + Cu^{2+} \rightarrow O_2 + Cu^{+}$

(2) $H_2O_2 + Cu^{+} \rightarrow Cu^{2+} + OH^{-} + OH_{*}$

Die Hydroxylradikale reagieren mit Lipiden und bilden unter Aufnahme von molekularem Sauerstoff Peroxidradikale. Diese autokatalytische Kettenreaktion führt zur Lipidperoxidation, die die Zusammensetzung der Plasmamembran nachhaltig verändert und den teilweisen Verlust der strukturellen Integrität nach sich zieht (Ouariti *et al*., 1997). Dieser Verlust der strukturellen Integrität hat in Wurzelzellen einen verstärkten K^{+}-Efflux zur Folge (De Vos *et al*., 1991). Zusätzlich führen Cu-Ionen zu einer Inhibierung des Primärwurzelwachstums und zu einer vermehrten Bildung von Sekundärwurzeln (Marschner, 1995).

Eine Hauptursache für die toxische Wirkung von nicht-essentiellen Cd^{2+} in der Zelle ist, dass Cd-Ionen im Vergleich zu Zn^{2+} eine höhere Affinität zu S- und N-Atomen in der Seitenketten von Aminosäuren besitzen. Auf diese Weise ist Cd^{2+} in der Lage Zn^{2+} aus den aktiven Zentren der Enzyme zu verdrängen und deren Funktion zu unterbinden (Fausto da Silva und Williams, 2001). Eine weitere Ursache für die Toxizität von Cd^{2+} ist die Fähigkeit, mit Ca^{2+} um Bindestellen in Proteinen zu kompetieren (Cheung, 1988; Olmos *et al*., 2003).

Pflanzen reagieren auf erhöhte Cd^{2+}-Exposition mit einer Inhibierung der Keimung und einem reduzierten Wurzelwachstum (Sanita di Toppi und Gabbrielli, 1999). In diesem Fall beruht die toxische Wirkung von Cd^{2+} u. a. auf der Inhibierung der wurzelspezifischen Fe^{3+}-Reduktase. Diese Inhibierung führt zu Fe^{2+}-Mangel und zu einer Reduktion der Photosyntheserate (Romera und Alcantara, 1994). Dabei kommt es zur Schädigung der in der Thylakoidmembran lokalisierten Antennenkomplexe (LHC II) sowie des Photosystems I und II und damit zu einer Verringerung des Gesamtchlorophyllgehalts (Krupa, 1988; Siedlecka und Baszynski, 1993; Larsson *et al*., 1998). Daneben beeinflusst Cd^{2+} den Wasserhaushalt der Pflanzen, indem es die Öffnung der Stomata

blockiert (Barcelo und Poschenrieder, 1990; Perfus-Barbeoch *et al.*, 2002). Auf Nukleinsäureebene beeinflusst Cd^{2+} die RNA-Synthese durch Inhibierung der Ribonukleaseaktivität und führt in hohen Dosen zu einer Fragmentierung der DNA (Shah und Dubey, 1995; Fojtova und Kovarik, 2000). Auf Proteinebene ist Cd^{2+} in der Lage, Zn^{2+} aus Zn-Finger Proteinen zu verdrängen bzw. Fe^{2+} in der Fe^{3+}-Reduktase zu ersetzten (Stohs und Bagchi, 1995; Sanita di Toppi und Gabbrielli, 1999). Obwohl Cd^{2+} im Gegensatz zu Cu-Ionen nicht redoxaktiv ist, kann durch Cd^{2+} die Bildung von ROS beschleunigt werden. Zusätzlich stabilisiert Cd^{2+} durch Chelatierung Phenoxylradikale und verstärkt so die oxidativen Eigenschaften der Radikale (Sakihama *et al.*, 2002).

Um die kontinuierliche Versorgung mit essentiellen Schwermetallen in physiologischen Konzentrationen zu gewährleisten und dabei die Aufnahme nicht-essentieller, toxischer Schwermetalle zu minimieren, haben Pflanzen wie alle anderen Organismen ein komplexes, homöostatisches Netzwerk entwickelt. Dieses Netzwerk kontrolliert sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf der Ebene des gesamten Organismus die Aufnahme, den Transport und die Entgiftung von Schwermetallen und ist auf diese Weise für die Ausprägung einer Grundtoleranz verantwortlich.

Auf zellulärer Ebene kontrolliert dieses Netzwerk die Aufnahme der Schwermetallionen über die Plasmamembran in das Zytosol, deren Komplexierung in der Zelle, den Transport der Komplexe zu den verschiedenen Kompartimenten oder Proteinen sowie Sequestrierung bzw. Einbau (siehe Abb. 1-1). Auf der Ebene des gesamten Organismus muss zusätzlich die Mobilisierung der Schwermetallionen aus dem Boden, der Langstreckentransport sowie die Remobilisierung und der Abtransport aus seneszentem Gewebe reguliert werden.

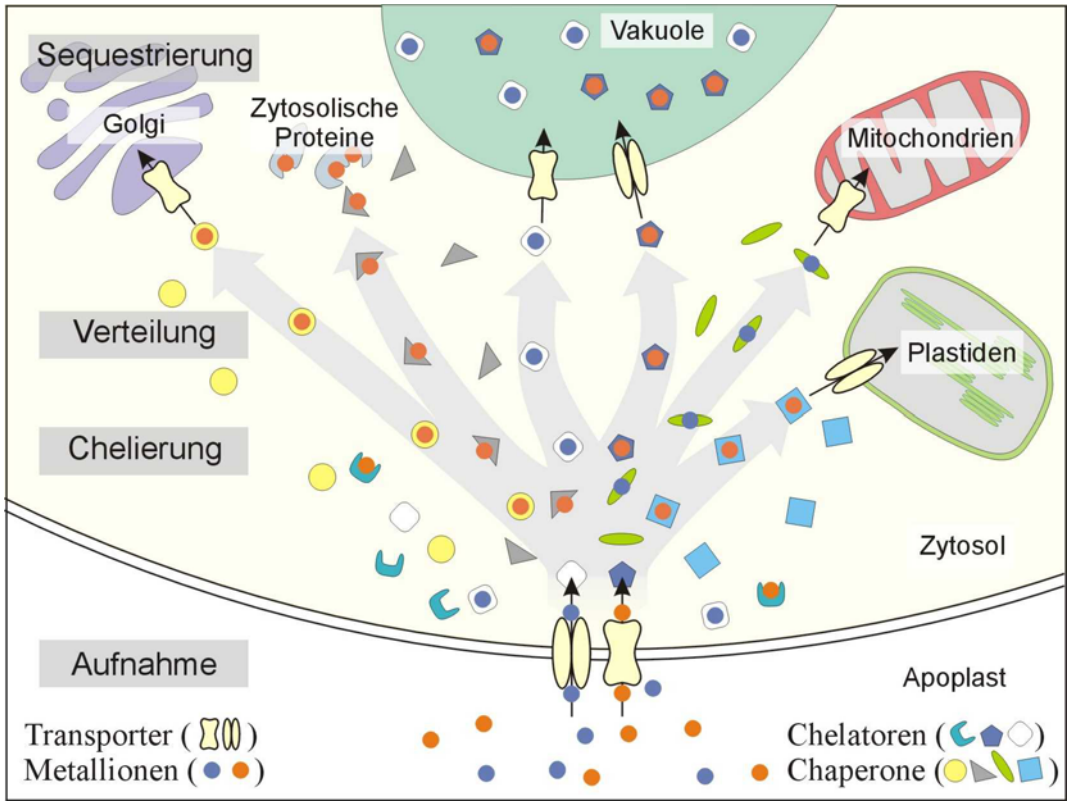


Abb. 1-1: Vereinfachtes schwermetallhomöostatisches Netzwerk
Nach der Aufnahme der Schwermetallionen über spezifische Transportproteine erfolgt die Bindung an Chelatoren und/oder Chaperone im Zytosol. Chelatoren dienen der zytosolischen Pufferung der Schwermetallionen. Chaperone verteilen essentielle Schwermetallionen zu Orten des Bedarfs, wie bestimmten zytosolischen Proteinen oder Organellen. Die Aufnahme in die einzelnen Organellen wird wiederum durch Transportproteine vermittelt, die mit den Chaperonen interagieren und damit wiederverwendet werden. Die Entgiftung und Lagerung überschüssiger Schwermetallionen bzw. Schwermetall-Chelator-Komplexe erfolgt durch die Sequestrierung in die Vakuole.

Defekte in einzelnen Komponenten dieses Netzwerks führen in Organismen entweder zu drastischen Krankheitsbildern oder zu abnormen Phänotypen. So kommt es beim Menschen durch Mutationen in Genen, die für Cu-Ionen exportierende P-Typ ATPasen kodieren, zu den schwerwiegenden Krankheitsbildern der Menkes-Krankheit oder der Wilson-Krankheit. Der Defekt im Menkes-Protein, das im Darm und den Nieren lokalisiert ist, führt durch Cu-Mangel u. a. zu geistiger Unterentwicklung und bei Säuglingen zum Tod. Das Wilson-Protein ist in Leberzellen lokalisiert. Dieser Gendefekt führt zu Cu-Überschuss und Cu-Toxizität. Neben Leberversagen kommt es zu abnormalen Bewegungsabläufen und Demenz (Andrews, 2002). Das Fehlen einer funktionalen Phytochelatinsynthase (PCS) führt im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bzw. in *Arabidopsis thaliana* zu einem Cd^{2+}-hypersensitiven Phänotyp (Vatamaniuk *et al*., 2001; Howden *et al*., 1995).
Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensart einer Vielzahl an Umwelteinflüssen ausgesetzt. An vielen Standorten kommt es aufgrund intensiver industrieller Nutzung der natürlichen Ressourcen zu einer erhöhten Schwermetallbelastung (Ernst und Joosse-van Damme, 1983). Aber auch durch natürliche Prozesse wie dem Zurückweichen der Gletscher nach dem Ende der letzten großen Eiszeit, Verwitterungsprozesse oder vulkanische Aktivitäten wurden schwermetallhaltige Böden freigelegt. Dieser lokal erhöhte Selektionsdruck führte dazu, dass nur Pflanzen, die auf Schwermetalltoleranzmechanismen selektiert wurden in der Lage waren, diese neu entstandenen ökologischen Nischen zu nutzen (Ernst, 1974). Diese erhöhte Toleranz gegenüber einzelnen Schwermetallen wird als Hypertoleranz bezeichnet (Chaney *et al*., 1997).
Zusätzlich zu Hypertoleranzmechanismen entwickelten einige Pflanzen die Fähigkeit, die im Boden enthaltenen Schwermetalle in den oberirdischen Geweben zu akkumulieren. Dabei werden Pflanzen, die mehr als 1 % Zn bzw. 0,1 % Ni, Co oder Pb bzw. 0,01 % Cd in der Trockenmasse anreichern als Hyperakkumulatoren definiert (Baker und Brooks, 1989). Bisher sind mehr als 400 hyperakkumulierende Arten aus den unterschiedlichsten Familien beschrieben . Diese besondere Eigenschaft wird auf dem Gebiet der Phytoremediation und des „Phytominig“ genutzt und ist daher von großem wirtschaftlichen Interesse (Anderson *et al*., 1998; Brooks *et al*., 1998; Bizily *et al*., 1999; 2000). Zudem dienen hyperakkumulierende Pflanzen als ideales Modellsystem, um die Mechanismen der Schwermetalltoleranz, der Aufnahme und des Transports, sowie der Akkumulation und der Detoxifizierung von Schwermetallen zu untersuchen (Bert *et al*., 2002).

1.2 Mobilisierung von Schwermetallen

Schwermetalle liegen im Boden entweder komplexiert oder ionisch vor (Ernst, 1974). Ihre Mobilität und damit ihre Verfügbarkeit für die Pflanzen wird durch mehrere Faktoren bestimmt.
Neben Tonmineralen, die aufgrund ihrer Kristallgitterstruktur und dem damit verbundenen negativen Ladungsüberschuss sowie ihrer großen Oberfläche die meisten Schwermetalle binden, sind u. a. auch Verwitterungsprozesse über die Bildung vom Schwermetalloxiden und –hydroxiden an der Immobilisierung von Schwermetallen beteiligt. Huminsäuren und Humine sind hochmolekulare, organische Substanzen, die Schwermetalle entweder als unlösliche Schwermetallverbindungen oder als lösliche Schwermetallkomplexe binden. Daneben ist die Remobilisierung und Freisetzung von Schwermetallen auch vom Salzgehalt des Bodens abhängig. Den stärksten Einfluss auf die Löslichkeit und damit die Verfügbarkeit von Schwermetallen besitzt der pH-Wert. Dabei sinkt mit steigendem pH-Wert die Löslichkeit der Schwermetalle. Neben dem pH-Wert ist der Gesamtgehalt an Schwermetallen die wichtigste Steuergröße für die Mobilität, da es sich bei den meisten Reaktionen, die die Verfügbarkeit bestimmen, um Gleichgewichtsreaktionen handelt (Harres, 1999; Hell und Stephan, 2003).
So haben Pflanzen zur Mobilisierung und Aufnahme von Eisen zwei unterschiedliche Strategien entwickelt. Die erste Strategie, die von allen Pflanzen außer *Gramineen* angewandt wird, beinhaltet die Ansäuerung der Rhizosphäre, eine Reduktion von Fe^{3+} durch die Fe^{3+}-Chelat-Reduktase und den Transport von Fe^{2+} in die Zelle. *Gramineen* verfolgen die zweite Strategie. Dabei werden Fe^{3+}-Chelatoren, sogenannte Phytosiderophore ausgeschieden. Der Fe^{3+}-Phytosiderophorkomplex gelangt anschließend über spezielle Transporter der Plasmamembran in die Zelle (Marschner, 1995). Auch unter Zn-Mangelbedingungen wurde eine Freisetzung von Phytosiderophoren in Weizen beobachtet (Zhang *et al*., 1989). Niedermolekulare Wurzelausscheidungen wie organische Säuren oder Phenole sind ebenfalls in der Lage, Cd^{2+}, Cu- oder Pb-Ionen zu mobilisieren und somit die Aufnahme dieser Schwermetalle zu beeinflussen (Mench *et al*., 1988).
Neben einer Ansäuerung des Bodens und der Ausscheidung bestimmter Chelatoren kann die Aufnahme von Schwermetallen auch durch im Boden lebende Mikroorganismen gesteigert werden (Whiting *et al*., 2001; Clemens *et al*., 2002a). Ebenso beeinflussen Mykorrhizapilze die Aufnahme von Schwermetallen in Pflanzen (Schützendübel und Polle, 2002).

1.3 Aufnahme von Schwermetallen in die Zelle

Die Aufnahme von Schwermetallen in die Zellen wird durch integrale Membranproteine, sogenannte Transporter, vermittelt. Mit Hilfe der heterologen Komplementation verschiedener *Saccharomyces cerevisiae*-Transportmutanten konnten zahlreiche Transporter für essentielle Schwermetalle in Pflanzen identifiziert werden.
Für die Aufnahme von Cu-Ionen konnte durch die Komplementation der *S. cerevisiae*-Mutante *ctr1-3*, die defizient in der hochaffinen Aufnahme von Cu-Ionen ist, vier Cu-Transporter COPT1-3, 5 („**COP**per **T**ransporter“) aus *A. thaliana* charakterisiert werden (Kampfenkel *et al*., 1995; Sancenon *et al*., 2003). RT-PCR-Analysen zeigten, dass *COPT1* und *COPT2* am stärksten in

Blättern, *COPT3* im Stängel, *COPT4* im Wurzelgewebe und *COPT5* hauptsächlich in Blättern und im Stängel exprimiert werden. Daneben wurde eine Reprimierung der Transkripte von COPT1 und COPT2 durch Cu^{2+}-Behandlung beobachtet (Sancenon *et al*., 2003).

Die Aufnahme von Fe^{2+} und Zn^{2+} erfolgt durch Transporter der ZIP-Familie („**Z**RT, **I**RT-like **P**roteins“) (Guerinot, 2000). Durch die Komplementation der Fe-transportdefizienten *S. cerevisiae*-Mutante *fet3/fet4* unter limitiertem Fe-Angebot (Eide *et al*., 1996) konnte die *A. thaliana*-cDNA *IRT1* („**I**ron-**R**egulated **T**ransporter 1“) isoliert werden. Das IRT1-Protein wird in der Plasmamembran von Wurzelepidermiszellen und Blüten exprimiert (Vert *et al*., 2002), durch Fe-Mangel transkriptionell induziert sowie posttranslational aktiviert (Connolly *et al*., 2002). Neben Fe^{2+} ist IRT1 auch in der Lage Cu^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+} und Zn^{2+} zu transportieren (Korshunova *et al*., 1999). IRT1 ist nicht nur an der Fe^{2+}-Homöostase (Varotto *et al*., 2002), sondern auch an der Zn^{2+}-Homöostase beteiligt (Henriques *et al*., 2002).

Weitere Mitglieder der ZIP-Familie aus *A. thaliana* konnten durch heterologe Komplementation der *S. cerevisiae*-Zn-transportdefizienten Mutante *zrt1/zrt2* identifiziert werden (Grotz *et al*., 1998). Die Transportproteine ZIP1, 2, 3 und 4 sind im Gegensatz zu IRT1 in der Lage, nur Zn^{2+} zu transportieren. Zusätzlich vermitteln ZIP1, 2 und 3 den Transport von Cu^{2+} und Cd^{2+}. ZIP1 und ZIP3 konnten in der Plasmamembran von Wurzelgewebe lokalisiert werden (Grotz *et al*., 1998).

In vergleichenden Untersuchungen konnte in der Kinetik der Zn^{2+}-Aufnahme zwischen dem Zn-Hyperakkumulator *Thlaspi caerulescens* und der nicht hyperakkumulierenden Art *Thlaspi arvense* bei gleichem K_M-Wert ein 4,5-fach erhöhter V_{MAX}-Wert ermittelt werden (Lasat *et al*., 1996). Außerdem war im Vergleich zu *T. arvense* die Zn-Konzentration im Xylemsaft von *T. caerulescens* um den Faktor fünf erhöht (Lasat *et al*., 1998). Durch Komplementation der Zn-transportdefizienten *S. cerevisiae*-Mutante *zhy3* konnte aus *T. caerulescens* ein Gen isoliert und charakterisiert werden, dessen Transkriptakkumulation im Wurzelgewebe mit den erhöhten Zn-Konzentrationen korreliert. Dabei handelte es sich um *ZNT1* („**Z**i**N**c **T**ransporter 1“), das neben dem Transport von Zn^{2+} auch den Transport von Cd^{2+} vermittelt (Pence *et al*., 2000). Vergleichbare Expressionsmuster zeigten weitere Mitglieder der ZIP-Familie (Assuncao *et al*., 2001).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Transportern sind weitere Aufnahmesysteme an der Beladung der Wurzelzellen mit Schwermetallen beteiligt. Für einzelne Mitglieder der Familie der Nramp-Transporter („**N**atural **R**esistance **A**ssociated **M**acrophage **P**rotein“) aus *A. thaliana* konnte u. a. eine Beteiligung an der Fe-Homöostase nachgewiesen werden. Die Transporter AtNRAMP1, 3 und 4 sind in der Lage, die Fe-transportdefiziente *S. cerevisiae*-Mutante *fet3/fet4* zu komplementieren (Curie *et al*., 2000; Thomine *et al*., 2000). Daneben konnte die Induktion der entsprechenden Transkripte unter Fe-Mangelbedingungen beobachtet werden. Durch Überexpression von *AtNRAMP3* in *A. thaliana* konnte auch eine Beteiligung an der Cd^{2+}-Aufnahme nachgewiesen werden (Thomine *et al*., 2000).

Über die funktionelle Charakterisierung einzelner Mitglieder der Familie der Mg^{2+}-Transporter (MGT) in *A. thaliana* war es möglich, für AtMGT1 und AtMGT10 eine mögliche Rolle in der Schwermetallaufnahme aus dem Boden zu postulieren. Durch Komplementationsexperimente der Mg^{2+}-transportdefizienten *Salmonella typhimurium*-Mutante MM281 konnte für AtMGT1 neben

der Aufnahme von Mg^{2+} auch die Aufnahme divalenter Schwermetallionen wie Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} und Cd^{2+} gezeigt werden. AtMGT10 ist in der Lage, neben Mg^{2+} auch den Transport von Cd^{2+} und Cu^{2+} zu vermitteln (Li *et al*., 2001). Die Transporter waren in allen untersuchten Geweben konstitutiv exprimiert. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen konnte AtMTG1 auf zellulärer Ebene in den peripheren Zellen der Wurzelspitze und in der Elongationszone der Wurzel lokalisiert werden (Li *et al*., 2001).

Auch membrangebundene Proteine wie die Annexine könnten an der Aufnahme von Cd^{2+} in die Wurzel beteiligt sein. Annexine besitzen keine Transmembrandomänen, sondern bilden mit konservierten hydrophilen Aminosäureresten eine Pore (Hofmann *et al*., 2000). Sie vergrößern auf diese Weise die Membranpermeabilität für Ca^{2+} (Gerke und Moss, 2002). Die dabei beobachtete Inhibierung des Ca^{2+}-Einstroms durch Cd^{2+} legt die Vermutung nahe, das Annexine an der Cd^{2+}-Aufnahme beteiligt sind (White *et al*., 2002). Im Genom von *A. thaliana* konnten neun Annexine identifiziert werden, die hauptsächlich in der Wurzel exprimiert sind (Clark *et al*., 2001).

Außer der Aufnahme von freien Schwermetallionen ist auch die Aufnahme von komplexierten Schwermetallionen möglich. In Maiswurzeln erfolgt der Transport von Fe^{3+}-Phytosiderophor-Komplexen in die Zelle über das YS1-Protein („**Y**ellow **S**tripe 1“) (Curie *et al*., 2001). Homologe Gene zu *YS1* konnten auch im Genom von *A. thaliana* identifiziert werden, so dass dieser Mechanismus wahrscheinlich nicht nur auf monokotyle Pflanzen beschränkt ist.

Neben essentiellen Schwermetallen kommen im Boden auch nicht essentielle Schwermetalle wie Cd oder Pb vor. Außer für Cd^{2+}, das in der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* für die Aktivität einer Carboanhydrase essentiell ist (Lane und Morel, 2000), konnte weder für Cd noch für Pb eine biologische Relevanz gefunden werden. Pflanzen nehmen diese toxischen Schwermetalle über Kationentransporter auf, die über ein breites Substratspektrum verfügen und wenig selektiv sind (Fox und Guerinot, 1998). So kann die Aufnahme von Cd^{2+} über die Fe^{2+}- bzw. Zn^{2+}-Transporter IRT1, ZNT1 und AtNRAMP3 erfolgen. Ein weiterer Kandidat für die unspezifische Cd^{2+}-Aufnahme ist für den Kationentransporter LCT1 („**L**ow-affinity **C**alcium **T**ransporter 1“). Durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* konnte neben einer Transportaktivität für Ca^{2+} auch eine Cd^{2+}-Transportaktivität nachgewiesen werden (Clemens *et al*., 1998).

Die Aufnahme von Pb^{2+} wird in Tabak durch das Calmodulin-bindende Protein NtCBP4 vermittelt (Arazi *et al*., 1999). NtCBP4 gehört zur Familie der durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kationenkanälen (CNGC). In *A. thaliana* wurde für eine T-DNA-Knockout-Mutante von *AtCNGC1*, dem Ortholog zu *NtCBP4*, eine erhöhte Pb^{2+}-Toleranz beschrieben (Sunkar *et al*., 2000).

1.4 Chelatierung der Schwermetallionen

Nach der Aufnahme in die Zelle erfolgt die Bindung der Schwermetallionen an Chelatoren oder Chaperone. Diese Bindung und der anschließende Transport zum Bestimmungsort sind notwendig, da freie Schwermetallionen u. a. Tertiärstrukturen von Proteinen zerstören können. Anhand von Untersuchungen zur Interaktion des Cu-Chaperons CCS („**C**opper **C**haperone for **S**OD“) mit der SOD1 in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass weniger als ein freies Cu-Atom pro Zelle

vorkommt (Rae *et al*., 1999). Ein ähnliches Ergebnis erhielten Outten und O'Halloran (2001) für die Menge an freiem Zn^{2+} in *E. coli*-Zellen.

Eine der Hauptaufgaben von Chelatoren ist die Detoxifizierung und die zytosolische Pufferung von Schwermetallen. Zu den Chelatoren werden organische Säuren wie Maleinsäure, Zitronensäure und Oxalsäure (Rauser, 1999), aber auch Aminosäuren, Phytochelatine und Metallothioneine gezählt.

In vergleichenden Untersuchungen zwischen der Ni-hyperakkumulierenden Art *Alyssium lesbiacum* und der nicht-hyperakkumulierenden Art *A. montanum* konnte nach Ni-Behandlung eine sogenannte Histidin-Antwort beobachtet werden (Krämer *et al*., 1996). Dabei stieg die Konzentration von Ni-Histidin-Komplexen im Xylemsaft von *A. lesbiacum* stark an. Ein identischer Effekt konnte in weiteren Ni-hyperakkumulierenden *Alyssium*-Arten beobachtet werden (Krämer *et al*., 1996). Allerdings konnte in anderen Ni-Hyperakkumulatoren wie *Thlaspi goesingense* diese Histidin-Antwort nicht beobachtet werden (Persans *et al*., 1999).

Das Peptid Nicotianamin (NA) kommt in allen Pflanzen vor und ist hauptsächlich am Phloemtransport von Fe- und Cu-Ionen beteiligt (Stephan *et al*., 1994; Pich und Scholz, 1996). Die Bildung von Nicotianamin wird durch die NA-Synthase aus drei Molekülen *S*-Adenosyl-Methionin katalysiert. Daneben erfolgt durch die Bildung von Fe^{2+}-Nicotianamin-Komplexen auch ein Schutz vor oxidativem Stress (von Wiren *et al*., 1999).

Die am besten in Pflanzen untersuchten Schwermetallchelatoren sind Phytochelatine (PC). PC sind kleine metallbindende Peptide folgender Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-Gly (n=2-11), die in Pflanzen und in der Hefe *S. pombe* nachgewiesen wurden (Zenk, 1996; Vatamaniuk *et al*., 2001; Clemens *et al*., 2001). Die Verknüpfung von Glutathion und Glutathionderivaten erfolgt durch die Phytochelatinsynthase (PCS), die über eine Transpeptidaseaktivität verfügt (Ha *et al*., 1999; Clemens *et al*., 1999; Vatamaniuk *et al*., 1999; Grill *et al*., 1985). Eine Aktivierung der PCS erfolgt posttranslational durch Schwermetallionen (Grill *et al*., 1989), sowie trankriptionell während früher Entwicklungsstadien in *A. thaliana* durch Cd^{2+} (Lee und Korban, 2002).

Mit Hilfe der PCS-defizienten *A. thaliana*-Mutante *cad1-3* konnte eine direkte Beteiligung von Phytochelatinen an der Cd^{2+}- und AsO_4^{2-}-Toleranz bzw. Detoxifizierung demonstriert werden (Ha *et al*., 1999). Obwohl die Phytochelatine die Hauptaufgabe bei der Cd^{2+}-Detoxifizierung übernehmen (Zenk, 1996), sind zur Ausprägung der bereits erwähnten Cd^{2+}-Hypertoleranz zusätzliche Mechanismen nötig (Ebbs *et al*., 2002; Schat *et al*., 2002).

Metallothioneine (MT) sind niedermolekulare, cysteinreiche, schwermetallbindende Proteine, die in allen Eukaryoten und einigen Prokaryoten vorkommen (Cobbett und Goldsbrough, 2002). Die Einteilung der Metallothioneine in vier Klassen basiert auf der Verteilung der Cysteinreste im Protein. Pflanzliche Metallothioneine können allen vier Klassen zugeordnet werden. Insgesamt konnten im Genom von *A. thaliana* sieben Metallothioneine identifiziert werden (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

Klasse-I MT dienen beispielsweise in Säugetieren der Aufrechterhaltung der Zn^{2+}-Homöostase und können Cd^{2+}-Toleranz vermitteln (Hamer, 1986; Masters *et al*., 1994). Ein Klasse-II MT ist CUP1 („**CU**-binding **P**rotein 1“) aus *S. cerevisiae*, das eine wichtige Rolle in der Cu-Homöostase spielt

(Hamer *et al*., 1985). Das erste aus ausdifferenzierten Weizenembryonen isolierte pflanzliche Metallothionein E_c („**E**arly **C**ys-labled“) ist ein Klasse-IV Metallothionein, welches Zn^{2+} binden kann (Lane *et al*., 1987).

Für einige Mitglieder der pflanzlichen Metallothioneinfamilie wurde eine transkriptionelle Aktivierung durch Schwermetalle, Seneszenz und nach Pathogenbefall gezeigt (Cobbett und Goldsbrough, 2002). So konnte durch heterologe Expression der *A. thaliana MT1* und *MT2* in der metallothioneindefizienten *S. cerevisiae*-Mutante *cup1* bzw. von *MT2* in der metallothioneindefizienten *Synechococcus*-Mutante PCC7942, die Beteiligung von Metallothioneinen an der Cu- und Zn-Toleranz gezeigt werden (Zhou und Goldsbrough, 1994; Robinson *et al*., 1996). Auch die vergleichende Untersuchung an zehn verschiedenen *A. thaliana* Ökotypen ergab eine Korrelation der Transkriptakkumulation der *MT1* und *MT2*-Gene mit einer erhöhten Cu-Toleranz (Murphy und Taiz, 1995; 1997). Im Wurzelgewebe der Cu-sensitiven *A. thaliana* Mutante *cup1-1* konnte als Folge der erhöhten Cu-Ionen-Aufnahme eine Induktion des *MT2a*-Gens beobachtet werden (van Vliet *et al*., 1995). Der Vergleich der Cu-hypertoleranten *Silene vulgaris* mit Cu-toleranten *Silene*-Arten zeigte, dass u. a. eine konstitutiv erhöhte Transkriptmenge sowie eine erhöhte Kopienanzahl des *SvMT2b*-Gens im Genom zur Hypertoleranz gegenüber Kupfer beitragen (van Hoof *et al*., 2001). Außerdem deutet die phloemspezifische Expression des *MT1a*-Gens in seneszenten Blättern von *A. thaliana* (Garcia-Hernandez *et al*., 1998; Butt *et al*., 1998) auf eine Beteiligung von Metallothioneinen an der Chelierung und dem Langstreckentransport von Cu-Ionen, die durch katabolische Prozesse während der Seneszenz freigesetzt werden, hin (Cobbett und Goldsbrough, 2002).

Metallochaperone sind kleine Cu-bindende Proteine, die den Transport der Cu-Ionen zu spezifischen Akzeptoren gewährleisten. Die Identifizierung und Charakterisierung von Cu-Chaperonen erfolgte erstmalig in *S. cerevisiae* für die Cu-Chaperone CCS, ATX1 („**A**n**T**i o**X**tidant 1“) und COX17 („**C**ytochrome C **OX**idase 17“). CCS ist für den Transport von Cu-Ionen zur Cu/Zn-Superoxid-Dismutase verantwortlich (Culotta *et al*., 1997). ATX1 liefert Cu-Ionen in den sekretorischen Weg über eine Cu-Ionen transportierende P-Typ-ATPase (Lin und Culotta, 1995). Das Cu-Chaperon COX17 ist für die Versorgung der Mitochondrien mit Cu-Ionen verantwortlich (Glerum *et al*., 1996).

Durch Komplementation von Cu-Chaperon-defizienten *S. cerevisiae*-Mutanten konnten eine Reihe von pflanzlichen Cu-Chaperonen identifiziert werden, die in Pflanzen identische Aufgaben übernehmen. *CCH* („**C**opper **CH**aperone“) ist das homologe Gen zu *ScATX1* in *A. thaliana* und wurde durch heterologe Komplementation der *S. cerevisiae atx1*-Mutante identifiziert (Himelblau *et al*., 1998). CCH wird in seneszenten Blättern und durch Ozon-Behandlung induziert und ist am Langstreckentransport von Cu-Ionen aus seneszentem Gewebe über das Phloem beteiligt (Mira *et al*., 2001). Im Gegensatz zu ScATX1 ist für AtCCH kein direkter Interaktionspartner bekannt. Möglicherweise stellt die Cu-Ionen transportierende P-Typ-ATPase RAN1 („**R**esponsive to **AN**tagonist 1“) ein Zielprotein dar. RAN1 ist für die Aufnahme von Cu-Ionen in post-Golgi-Vesikel und die damit verbundene Verteilung von Cu-Ionen an Proteine des sekretorischen Weges verantwortlich (Hirayama *et al*., 1999; Woeste und Kieber, 2000). Dazu zählt der Ethylenrezeptor

ETR1 („**E**thylen **T**riple **R**esponse 1“), der für die Bindung von Ethylen Cu-Ionen als Kofaktor benötigt (Rodriguez *et al*., 1999). Insgesamt konnten im Genom von *A. thaliana* 31 homologe Gene zu *ScATX1* identifiziert werden (Wintz und Vulpe, 2002). Darunter befindet sich auch das schwermetallbindende Protein *CdI19* („**Cd I**nduced 19“), dass als Cd^{2+}-induziertes Gen identifiziert wurde (Suzuki *et al*., 2001). CdI19 ist in der Lage, sowohl Cd^{2+} als auch Cu- und Hg-Ionen zu binden. Durch die Überexpression von *CdI19* in *A. thaliana* wurde eine erhöhte Cd^{2+}-Toleranz erreicht (Suzuki *et al*., 2002). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass homologe Gene zu *ScATX1* neben der Funktion als Cu-Chaperone zu fungieren, auch an der Detoxifizierung nichtessentieller Schwermetalle beteiligt sind.

Auch für die *ScCCS* konnten homologe Gene im Genom der Tomate und von *A. thaliana* identifiziert werden (Zhu *et al*., 2000).

Durch die Komplementation der metallochaperondefizienten *S. cerevisiae*-Mutante *cox17* konnten in *A. thaliana* zwei homologe Gene zu COX17 identifiziert und charakterisiert werden, die möglicherweise an der Beladung der Mitochondrien mit Cu-Ionen oder dem Transport von Cu-Ionen innerhalb der Wurzel beteiligt sind (Wintz und Vulpe, 2002). Ebenso könnte AtCOX17 am Schutz vor oxidativem Stress, der nach Pathogenbefall in Mitochondrien durch freigesetzte Cu-Ionen ausgelöst wird, beteiligt sein (Balandin und Castresana, 2002).

1.5 Export und intrazelluläre Verteilung der Schwermetalle

Die Entfernung überschüssiger Schwermetallionen aus dem Zytosol kann neben der Kompartimentierung in die Vakuole und/oder die Plastiden auch alternativ durch Export erfolgen. Erstmals konnte der Export von Cd^{2+} für einen *A. thaliana*-Transporter AtDTX1 („**D**e**T**o**X**ification 1“) in einem heterologen System demonstriert werden. Der Plasmamembran-lokalisierte Transporter AtDTX1 gehört zur Familie der MATE-Transporter („**M**ultidrug **A**nd **T**oxic compound **E**xtrusion“) und vermittelt in *E. coli* KAM3-Zellen Cd^{2+}-Toleranz durch Export (Li *et al*., 2002).

Daneben kann der energieabhängige Export von Schwermetallen in den apoplastischen Raum auch durch P-Typ-ATPasen erfolgen. In Bakterien wird die Entgiftung von Schwermetallen hauptsächlich durch P-Typ-ATPasen vermittelt (Nies, 1999). Sequenzuntersuchungen dieser bakteriellen ATPasen ergaben das gemeinsame Sequenzmotiv (CPx) für den Export von Schwermetallen (Solioz und Vulpe, 1996). Mehrere Mitglieder der Familie der CPx-ATPasen konnten auch im Genom von *A. thaliana* identifiziert werden (Tabata *et al*., 1997; Williams *et al*., 2000). Allerdings zeigt das Beispiel der Cu-Ionen transportierenden ATPase RAN1, dass der Export von Schwermetallen auch in andere Kompartimente erfolgen kann (Hirayama *et al*., 1999).

Neben P-Typ-ATPasen vermitteln auch Ca^{2+}-ATPasen den intrazellulären Transport von Schwermetallen. Durch die Komplementation des *S. cerevisiae*-Stammes K616, der defizient für eine im Golgiapparat lokalisierte und eine vakuoläre Ca^{2+}-Pumpe ist, mit der aus *A. thaliana* stammenden, ER-lokalisierten Ca^{2+}/Mn^{2+}-ATPase AtECA1 („**E**R-type **CA**lcium pump 1“), konnte der Transport von Mn^{2+} und Zn^{2+} gezeigt werden (Wu *et al*., 2002).

Eine Vielzahl von Transportproteinen befindet sich auch in der Tonoplastenmembran, da die Vakuole in Pflanzenzellen als der Hauptspeicherort für toxische Verbindungen fungiert. So erfolgt die Entgiftung von Cd^{2+} in Form von Cd^{2+}-Phytochelatinkomplexen durch den Transport in die Vakuole. Die Abhängigkeit dieses Transportes von Mg^{2+}-ATP und die Hemmbarkeit durch Vanadat lässt die Beteiligung von ABC-Transportern („**A**TP-**B**inding **C**assette“) vermuten (Vögeli-Lange und Wagner, 1990; Salt und Rauser, 1995). In *S. pombe* wird dieser vakuoläre Transportvorgang durch den ABC-Transporter HMT1 („**H**eavy **M**etal **T**ransporter 1“) vermittelt (Ortiz *et al*., 1992; 1995). Allerdings konnte im Genom von *A. thaliana* kein homologes Gen zu *SpHMT1* identifiziert werden, so dass der Transport von Cd^{2+}-Phytochelatinkomplexen in die Vakuole von anderen ABC-Transportern übernommen werden muss (Sanchez-Fernandez *et al*., 2001).
In *S. cerevisiae* erfolgt die Detoxifizierung von Cd^{2+} in Form von bis-Glutathion-Cd^{2+}-Komplexen über den ABC-Transporter ScYCF1 („**Y**east **C**admium **F**actor 1“) (Li *et al*., 1997). Eine unvollständige Komplementation der Δ*ycf1*-Mutante konnte bisher nur mit dem ABC-Transporter AtMRP3 („**M**ultidrug resistance **R**elated **P**rotein 3“) erreicht werden (Tommasini *et al*., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass neben *AtMRP3* auch *AtMRP7* an der Cd^{2+}-Entgiftung beteiligt ist (Bovet *et al*., 2003).
Auch für Mitglieder der Familie der CDF-Transporter („**C**ation **D**iffusion **F**acilitator“) sind Aufgaben in der Schwermetallhomöostase beschrieben. Im Bakterium *Ralstonia eutropha* vermittelt CzcD („**C**admium, **Z**ink, **C**obalt Operon **D**“) den Export von Zn^{2+} über die innere Membran in den periplasmatischen Raum (Anton *et al*., 1999). Durch Überexpression der in der Vakuolenmembran lokalisierten CDF-Transporter COT1 und ZRC1 („**CO**balt **T**olerance 1“, „**Z**inc **R**esistance **C**onferring 1“) aus *S. cerevisiae* konnte eine erhöhte Toleranz der Hefezellen gegenüber Co^{2+} bzw. Cd^{2+} und Zn^{2+} gezeigt werden (Conklin *et al*., 1992; Kamizono *et al*., 1989; Li und Kaplan, 1998). In *S. pombe* ist der CDF-Transporter SpZhf („**Z**inc **H**omeostasis **F**actor“) an der Beladung des ER mit Zn^{2+} beteiligt (Clemens *et al*., 2002b). Der Zn^{2+}-sensitive Phänotyp der *zhf*-Mutante konnte mit dem *A. thaliana* CDF-Transporter ZAT1 („**Z**inc transporter from ***A****rabidopsis* ***T****haliana* 1“) komplementiert werden (Bloss *et al*., 2002). In *A. thaliana* konnte durch die konstitutive Überexpression von *AtZAT1* eine erhöhte Zn^{2+}-Toleranz erreicht werden (van der Zaal *et al*., 1999). Interessanterweise zeigte die *zhf*-Deletionsmutante auch einen Cd^{2+}-toleranten Phänotyp. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Cd^{2+} erst im ER seine toxische Wirkung entfaltet.
Vakuoläre Ca^{2+}/H^{+}-Antiporter der CAX-Familie („**CA**lcium e**X**changer“) können neben Ca^{2+} auch divalente Schwermetallionen unspezifisch transportieren. Für AtCAX2 wurde eine Beteiligung an der Mn^{2+}-Detoxifizierung in *S. cerevisiae* gezeigt (Schaaf *et al*., 2002). Außerdem war das Transkript des Transporters *AtCAX1* durch Behandlung mit Ni^{2+} induzierbar (Hirschi, 1999).

1.6 Regulationsmechanismen und Signaltransduktionswege als Antwort auf Stressfaktoren

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Prozesse der Mobilisierung von Schwermetallen, deren Aufnahme und Transport, Chelatierung und Sequestrierung beschrieben. Wie schon erwähnt, muss

jeder dieser Schritte genau reguliert werden, um eine ideale Versorgung der Pflanze zu gewährleisten. Zusätzlich muss die Pflanze in der Lage sein, auch unter veränderten Umweltbedingungen dieses homöostatische Netzwerk aufrechtzuerhalten. Für ein Verständnis dieses Netzwerkes sind Informationen über die beteiligten Signalketten, die daran behilflichen Proteine und die stressspezifischen Antwortreaktionen wichtig. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten anschließend biotechnologisch zur Verbesserung der Toleranz gegenüber einzelnen Stressfaktoren genutzt werden. So konnte durch Überexpression des pflanzlichen Transkriptionsfaktors DREB1A („**D**ehydration-**R**esponsive **E**lement **B**inding-1A“) eine erhöhte Toleranz gegenüber Trockenheit, Salzstress und Kälte erreicht werden (Kasuga *et al*., 1999).
Vergleicht man bekannte Signaltransduktionswege verschiedener abiotischer und biotischer Stressfaktoren und deren identifizierte Komponenten, lassen sich Gemeinsamkeiten ableiten, die notwendig für die Weiterleitung des Signals sind (Abb. 1-2).
So steht am Anfang jedes Signaltransduktionsweges die Erkennung des Stimulus. Nach dessen Erkennung kommt es zur Bildung von sekundären Botenstoffen („second messenger“), die in der Lage sind, Proteinphosphorylierungskaskaden zu aktivieren. Mögliche Zielproteine solcher Kaskaden sind neben Proteinen, die direkt in der stimulusspezifischen Abwehr involviert sind und zu einer Erhöhung der Toleranz beitragen können, auch Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation stressresponsvier Gene beteiligt sind. Diese Genprodukte können u. a. an der Bildung von weiteren regulatorischen Molekülen, wie pflanzlichen Hormonen (ABA, Ethylen, SA oder JA) beteiligt sein, die ihrerseits weitere Signaltransduktionswege aktivieren können.

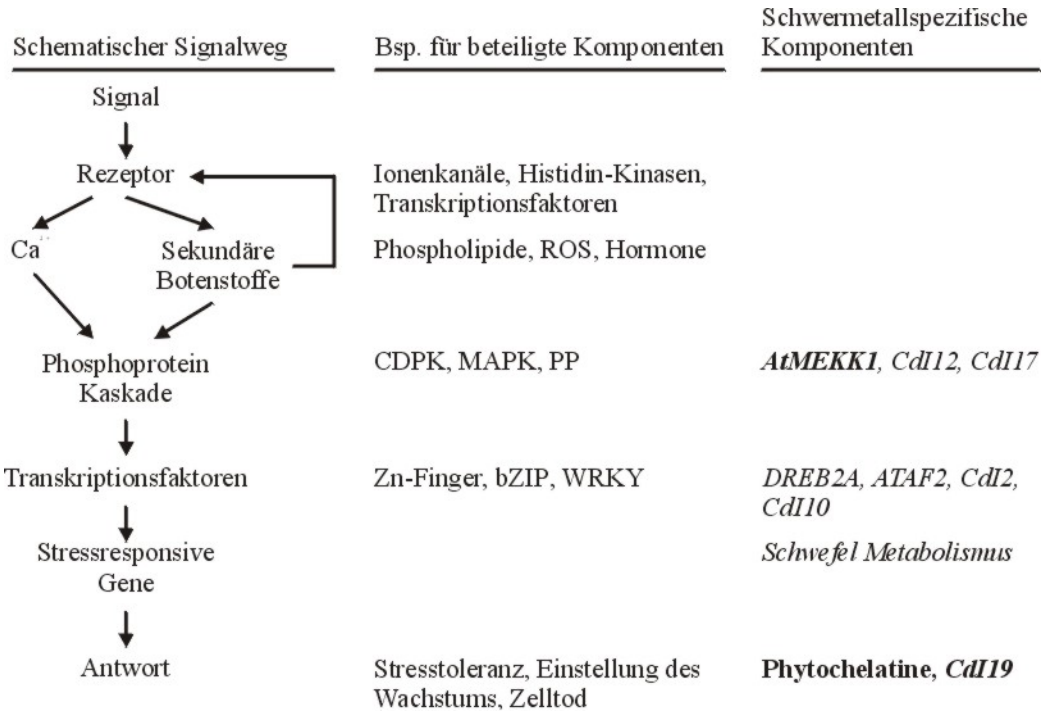


Abb. 1-2: Schematische Signaltransduktionskaskade für abiotische Stressfaktoren.
Dargestellt ist eine schematische Signaltransduktionskaskade für abiotische Stressfaktoren von der Perzeption des Signals bis zur Antwortreaktion. Beispielhaft ist erklärt, welche grundsätzlichen Komponenten daran beteiligt sind. Zusätzlich sind in der rechten Spalte Komponenten der schwermetallspezifischen Signaltransduktion aufgelistet. Eine transkriptionelle Aktivierung ist kursiv dargestellt. Komponenten, die zur Erhöhung der Toleranz beitragen sind in fetten Buchstaben dargestellt.

1.6.1 Perzeption von Stresssignalen

Abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Trockenheit, Salz oder Schwermetalle sind komplexe Reize, die die Pflanzenzelle mit unterschiedlichen Informationen versorgen. Beispielsweise bestehen Salz- oder Schwermetallstress aus einer ionischen (chemischen) und einer osmotischen (physikalischen) Komponente (Xiong *et al.*, 2002). Daher ist es wahrscheinlich, dass ein bestimmter Sensor nur eine Komponente des Stresses wahrnehmen und damit nur einen Teilaspekt der Stressantwort initiieren kann. Um eine komplexe Stressantwort auszulösen, muss daher die Zelle die einzelnen Facetten eines Stresses durch unterschiedliche Sensorsysteme wahrnehmen. So beeinflusst beispielsweise Kälte neben der Membranfluidität auch die Konformation intrazellulärer Proteine (Murata und Los, 1997).
Da viele abiotische Stressfaktoren einen transienten Ca^{2+}-Einstrom in das Zytosol auslösen (Knight, 2000), bieten sich Ca^{2+}-Kanäle als mögliche Sensoren an. So führten physikalische Veränderungen in der Zellmembran, z. B. hervorgerufen durch Kälte, zur Aktivierung von Ca^{2+}-Kanälen in *A. thaliana* (Plieth *et al*., 1999).
Mit der Familie der Histidinkinasen stehen Pflanzen eine weitere Klasse von möglichen Sensoren zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass die membranständige Histidinkinase AtHK1 im heterologen *S. cerevisiae*-System die Osmolarität im extrazellulären Raum messen und in ein internes Phosphorylierungssignal umwandeln kann (Urao *et al*., 2000).
Im Gegensatz zu pilzlichen und tierischen Modellsystemen ist in Pflanzen kein Sensor für Schwermetalle bekannt. Für die Aufrechterhaltung der Cu-, Fe- und Zn-Homöostase stehen *S. cerevisiae* mehrere Transkriptionsfaktoren als Sensorsysteme zur Verfügung. Dabei kommt es zu einer direkten Bindung der Schwermetalle an Transkriptionsfaktoren. Für Mac1 („**M**etal binding **AC**tivator 1“) wurde unter Kupfermangelbedingungen die transkriptionelle Aktivierung der Cu^{+}-spezifischen Aufnahmesystemen *FRE1* („**F**erric **RE**ductase 1“), *CTR1* und *CTR3* („**C**opper **TR**ansporter 1, 3“) gezeigt (Labbe *et al*., 1997). Im Gegensatz dazu aktiviert Ace1 („**A**ctivation of ***C****UP1* **E**xpression 1“) bei Cu^{+}-Überschuss die Expression von Detoxifizierungssystemen, wie der *SOD1* oder dem Metallothionein *CUP1* (Thiele, 1988; Carri *et al*., 1991). Aft1 („**A**ctivator of **F**errous **T**ransport 1“) zeigte eine Fe^{3+}-abhängige DNA-Bindung und ist unter Mangelbedingungen für die Aktivierung des Eisenaufnahmesystems *FRE1*, *FRE2* und *FET3* („**FE**rrous Iron **T**ransporter 3“) verantwortlich (Yamaguchi-Iwai *et al*., 2002; 1995). Für den Zn^{2+}-Sensor Zap1 („**Z**inc-responsive **A**ctivator **P**rotein 1“) wurde ebenfalls unter Zn^{2+}-Mangelbedingungen die transkriptionelle Aktivierung der Zn^{2+}-Transporter *ZRT1* und *ZRT2* („**Z**inc-**R**egulated **T**ransporter

1, 2“) gezeigt (Zhao und Eide, 1997). Mikroarraystudien belegten die Bedeutung von Zap1 für die Regulation der Zn-Homöostase in *S. cerevisiae* (Lyons *et al*., 2000).
In tierischen Systemen spielt die Regulation von Metallothioneinen in der Zn-Homöostase und Zn-Detoxifizierung eine wichtige Rolle. Für deren Regulation ist die Interaktion von metallresponsiven Elementen (MRE) in den Promotoren der Metallothioneingene mit dem MRE-bindenden Transkriptionsfaktor MTF-1 notwendig. Wie im Fall von Mac1, Ace1oder Zap1 misst MTF-1 die intrazelluläre Zn^{2+}-Konzentration durch direkte Bindung von Zn^{2+} (Giedroc *et al*., 2001).
Da bis jetzt noch keine pflanzlichen Homologe zu diesen Schwermetallsensoren identifiziert werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass Pflanzen andere Systeme zur Messung der intrazellulären Schwermetallgehalte entwickelt haben.

1.6.2 Intrazelluläre sekundäre Botenstoffe

Wie bereits erwähnt, erfolgt als eine der ersten Antworten auf abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Trockenheit oder Salzstress ein transienter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (Knight, 2000). Viele unterschiedliche Stressfaktoren benutzen Ca^{2+} als Signalmolekül. Dabei wird die Effizienz und die Spezifität zellulärer Antworten durch die Frequenz, die Amplitude von zytosolischen Ca^{2+}-Schwingungen und deren Lokalisierung innerhalb der Zelle beeinflusst (Staxen *et al*., 1999; Allen *et al*., 1999; 2001). Diese stressspezifischen Ca^{2+}-Signaturen werden über spezifische Sensoren wie Ca^{2+}-bindende Proteine decodiert und führen so zu einer stressspezifischen Antwort.
Sowohl durch osmotischen Stress als auch durch Schwermetallstress kommt es zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran (Munnik *et al*., 1998; Ouariti *et al*., 1997). Wie Ca^{2+} fungieren auch Phospholipide wie z. B. Phosphotidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) als sekundäre Botenstoffe (Munnik *et al*., 1998). Dabei wird PIP_2, die Vorstufe von IP_3 mittels der PIPK5 (**P**hosphat**I**dylinositol 4-**P**hosphat 5-**K**inase) synthetisiert. Für *AtPIPK5* konnte durch eine Reihe von Stressfaktoren eine transkriptionelle Aktivierung beobachtet werden (Mikami *et al*., 1998). Die Hydrolyse von PIP_2 zu IP_3 erfolgt durch die Phospholipase C (PLC). Für *AtPLC1* wurde ebenfalls eine transkriptionelle Aktivierung durch Salzstress, Trockenheit und Kälte beobachtet (Hirayama *et al*., 1995). Neben der transkriptionellen Aktivierung von Genen der IP_3-Synthese konnte durch Salzstress in *A. thaliana*-Zellkulturen eine Zunahme der PIP_2- und der IP_3-Konzentration beobachtet werden (DeWald *et al*., 2001).
Eine weitere Klasse sekundärer Botenstoffe stellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar. Durch Trockenheit, Kälte, Salzstress sowie Schwermetallstress werden ROS wie Superoxid, H_2O_2 und Hydroxylradikale gebildet (Hasegawa et al., 2000; Kap 1.1). Neben ihrer zerstörerischen Wirkung sind ROS notwendige Komponenten von Signaltransduktionskaskaden, die der Pflanze helfen, sich ständig wechselnden Umweltbedingungen anzupassen (Neill *et al*., 2002).
In cDNA-Mikroarray-Analysen des Transkriptoms von *A. thaliana* nach H_2O_2-Behandlung konnten eine Reihe von Genen mit veränderter Expression identifiziert werden (Desikan *et al*., 2001). Dazu zählten Gene mit einer Funktion in der Stressantwort, Signaltransduktion sowie Transkription.

Viele der H_2O_2-responsiven Gene standen in keinem direkten Zusammenhang mit oxidativen Stress. Diese Beobachtung lässt sich über die Bildung von H_2O_2 durch andere biotischen und abiotischen Stressfaktoren erklären. Dies zeigt, dass Pflanzen ROS für die Übermittlung von Signalen vieler unterschiedlicher Stressfaktoren nutzen.

1.6.3 Weiterleitung über Signaltransduktionskaskaden

Die Weiterleitung der generierten sekundären Signale erfolgt anschließend über Proteinkinasen, die die γ-Phosphatgruppe von ATP reversibel auf Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste von Zielproteinen übertragen. Die Reversibilität dieser Phosphorylierung wird durch Proteinphosphatasen gewährleistet.

Die transiente Veränderung von zytosolischen Ca^{2+}-Konzentrationen kann durch Ca^{2+}-abhängige Proteinkinasen (CDPK) wahrgenommen werden. CDPK gehören zur Gruppe der Serin/Threonin-Proteinkinasen und besitzen eine C-terminale calmodulinähnliche Domäne. In dieser Domäne sind bis zu vier EF-Hände lokalisiert, die direkt Ca^{2+} binden können (Cheng *et al*., 2002). Für einige CDPK konnte eine Induktion bzw. Aktivierung durch abiotischen Stress gezeigt werden, so dass für diese CDPK eine Rolle in der Weiterleitung des Stresssignals postuliert wird (Cheng *et al*., 2002). In Tabak-Zellkulturen wurde durch Inhibitorstudien gezeigt, dass die durch Cd^{2+}-induzierte Bildung von H_2O_2 von Ca^{2+}-bindenden Proteinen abhängig ist (Olmos *et al*., 2003).

Neben CDPK spielen auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) eine wichtige Rolle in der Übermittlung von Signalen. MAP-Kinasen sind Teil von Signaltransduktionskaskaden, den sogenannten MAPK-Kaskaden. Diese Kaskaden setzen sich aus MAP-Kinasen, übergeordneten MAPK-Kinasen (MAPKK) und MAPKK-Kinasen (MAPKKK) zusammen. MAPKKK aktivieren MAPKK durch Phosphorylierung konservierter Serin- und Threoninreste, die ihrerseits MAPK an konservierten Tyrosin- und Threoninresten phosphorylieren und aktivieren.

Eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der Signaltransduktion in Pflanzen konnte für eine Vielzahl abiotischer Stimuli gezeigt werden (Jonak *et al*., 2002). Neben der transkriptionellen Aktivierung von *AtMPK3* durch Trockenheit, Kälte, Salzstress und mechanische Beanspruchung (Mizoguchi *et al*., 1996) wurde auch eine posttranslationale Aktivierung von AtMPK3 durch H_2O_2 beobachtet. Durch die Expression der konstitutiv aktivierten MAPKK-Kinase ANP1 („**A**rabidopsis **N**PK-1 related **P**rotein 1“) wurde ebenfalls eine Aktivierung von AtMPK3 beobachtet (Kovtun *et al*., 2000). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass ANP1 für die Aktivierung H_2O_2-responsibler Promotoren und damit für die Signalspezifität notwendig ist (Kovtun *et al*., 2000).

Suzuki *et al*. (2001) zeigten mit Hilfe von Inhibitorstudien, dass die Proteinphosphorylierung auch bei der schwermetallspezifischen Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt. Daneben wurde gezeigt, dass das Transkript von *AtMEKK1* durch Cd^{2+} induziert wird. Die heterologe Expression von *AtMEKK1* in *S. cerevisiae* führte zu einer Erhöhung der Toleranz gegenüber Cd^{2+} (Suzuki *et al*., 2001).

In Petersilie-Zellkulturen konnte nach der Behandlung mit Schwermetallen die Aktivierung von PcMPK6 gezeigt werden (Kroj *et al*., 2003).

Neben der Phosphorylierung von Proteinen ist die Dephosphorylierung ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus von Signaltransduktionskaskaden. So konnte für die Proteinphosphatase 2C MP2C („**M**edicago **P**roteinphosphase **2C**“) aus *Medicago sativa in vitro* die Inaktivierung der wundinduzierten MAP-Kinase SAMK („**S**tress **A**ctivated **M**AP**K**“) gezeigt werden (Meskiene *et al*., 1998). Daneben ist MP2C in *S. cerevisiae* in der Lage, sowohl den Pheromon-induzierten als auch den osmoregulatorischen MAPK-Signaltransduktionsweg durch Inaktivierung der MAPKK-Kinase Ste11p („**Ste**rility 11“) zu unterdrücken (Meskiene *et al*., 1998). Dabei stimmten der zeitliche Verlauf der wundinduzierten Expression von *MP2C* und der Inaktivierung des SAMK-Signalweges überein, so dass MP2C möglicherweise an der negativen Regulation des SAMK-Signalweges beteiligt ist (Rodriguez, 1998).
Für ein Mitglied der Familie der MAPK-Phosphatasen (MKP) konnte in *A. thaliana* eine Beteiligung an der negativen Regulation von UV- und Salzstress gezeigt werden. Dabei interagiert AtMKP1 direkt mit AtMPK3, 4 und 6 (Ulm *et al*., 2002).

1.6.4 Transkriptionelle Aktivierung von stressresponsiven Genen

Durch die Verwendung von Mikroarrays konnten für viele abiotische Stressfaktoren, wie Trockenheit, Kälte, osmotischer und oxidativer Stress, sowie Eisenmangel in *A. thaliana* eine große Anzahl von stressresponsiven Genen identifiziert werden (Kreps *et al*., 2002; Seki *et al*., 2002; Desikan *et al*., 2001; Thimm *et al*., 2001). Allerdings ist das Wissen über die Signalwege, die zur transkriptionellen Aktivierung dieser Gene führen, sehr begrenzt. Ein gut untersuchtes Beispiel für die transkriptionelle Aktivierung ist das durch Kälte und Trockenheit regulierte Gen *RD29A*. Im Promotor von *RD29A* konnten sogenannte „drought responsive elements“ (DRE) identifiziert werden (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1994). Eine Bindung an dieses *cis*-Element und die damit verbundene Trankription stressresponsiver Gene wurde in *A. thaliana* für zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren DREB1 und DREB2 („**D**ehydration **R**esponsive **E**lement **B**inding 1, 2“) nachgewiesen (Liu *et al*., 1998). Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren erfolgt schnell und transient durch Kälte, Trockenheit oder Salzstress (Nakashima *et al*., 2000; Liu *et al*., 1998).
Wie schon in Kap. 1.6 beschrieben, führt die Überexpression des Transkriptionsfaktors DREB1A zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Trockenheit, Salzstress und Kälte (Kasuga *et al*., 1999). Diese erhöhte Toleranz wird dabei durch die verstärkte Transkription der Zielgene des Transkriptionsfaktors erreicht.
Mit Hilfe von Mikroarrayuntersuchungen in *S. cerevisiae* konnten Aspekte der Zn^{2+}-Homöostase untersucht werden. Dabei wurde gezeigt, dass ungefähr 15 % aller Gene durch Zinkmangel transkriptionell reguliert werden. Daneben wurde für 46 Gene eine direkte Aktivierung durch den Zn^{2+}-bindenden Transkriptionsfaktor Zap1 nachgewiesen (Lyons *et al*., 2000).
In *A. thaliana* wurden nach Cd^{2+}-Behandlung transkriptionell induzierte Gene identifiziert, die für mögliche Signaltransduktionskomponenten wie Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren kodieren (Suzuki *et al*., 2001).

Ein weiteres Beispiel für die transkriptionelle Kontrolle durch Schwermetalle ist die Induktion der Gene des Schwefelstoffwechsels durch Cd^{2+} (Harada *et al*., 2002). Die Steuerung dieses Prozesses setzt voraus, dass die Pflanzenzelle in der Lage ist, erhöhte Cd^{2+}-Konzentrationen zu erkennen, das Signal weiterzuleiten und anschließend die Transkription stressspezifischer Antwortgene zu regulieren.

1.7 Mechanismen der Schwermetalltoleranz und Schwermetallhyperakkumulation

Über die molekularen Mechanismen, die zu einer erhöhten Schwermetalltoleranz bzw. zur Hyperakkumulation von Schwermetallen führen, ist sehr wenig bekannt. Die erhöhte Toleranz oder Hypertoleranz ist in der Regel spezifisch für ein Schwermetall (Verkleij und Schat 1990). In *Silene vulgaris* konnte eine erhöhte Expression von Metallothioneingenen sowie eine erhöhte Kopienzahl im Genom mit einer Erhöhung der Toleranz gegenüber Cu-Ionen in Zusammenhang gebracht werden (van Hoof *et al*., 2001). Untersuchungen zur Cu-Toleranz an zehn Ökotypen von *A. thaliana* zeigten, dass die Cu-Toleranz mit der Expression von Metallothioneingenen korreliert (Murphy und Taiz 1995).

Eine Beteiligung von Phytochelatinen an einer erhöhten Toleranz gegenüber Schwermetallen konnte durch Untersuchungen von toleranten Ökotypen mit hypertoleranten Ökotypen von *S. vulgaris* ausgeschlossen werden (De Knecht *et al*., 1995). Pharmakologische Studien zur Toleranz, Hypertoleranz und Hyperakkumulation zeigten ebenfalls, dass in hypertoleranten und hyperakkumulierenden Arten diese Merkmale unabhängig von Phytochelatinen sind (Schat *et al*., 2002).

Wie schon für Nickel erwähnt, steht die Ni-Hypertoleranz in *Thlaspi goesingense* in engem Zusammenhang mit der sogenannten Histidin-Antwort (Krämer *et al*., 1996). Vergleichende Untersuchungen mit der nicht-hypertoleranten Art *T. arvense* zeigten, dass die Hypertoleranz u. a. auf eine erhöhte Aufnahme von Nickel in die Vakuole zurückzuführen ist (Krämer *et al.*, 2000).

Der Vergleich der Zn-Aufnahme in isolierte Tonoplasten eines Zn-hypertoleranten und eines nicht-hypertoleranten Ökotyps von *S. vulgaris* demonstrierten eine um den Faktor zwei bis drei erhöhte Aufnahme von Zink in den hypertoleranten Ökotyp (Chardonnes *et al*., 1999).

Der Vergleich der Zn-Aufnahme in den Zn-Hyperakkumulator *T. caerulescens* mit *T.arvense* zeigte, dass bei gleicher Zn-Aufnahme in die Vakuolen der Wurzeln im Hyperakkumulator ein zweifach höherer Efflux gemessen werden konnte (Lasat *et al*., 1998). Das deutet darauf hin, dass in *T. caerulescens* mehr Zn in das Xylem geladen werden kann und anschließend im Spross hyperakkumuliert. Zusätzlich wurde im Hyperakkumulator *T. caerulescens* eine konstitutiv höhere Expression von Zn-Transportergenen gezeigt (Pence *et al*., 2000; Assuncao *et al*., 2001).

Durch Mikroarray-Analysen von *A. halleri* und *A. thaliana* wurden eine Reihe von Genen identifiziert, die im Zn^{2+}- und Cd^{2+}-Hyperakkumulator *A. halleri* z. T. bis zu 70-fach höher exprimiert waren (Weber *et al*., in Druck). So konnte durch die Komplementation der Zn-transportdefizienten *S. pombe*-Mutante *zhf* mit einer Isoform der Nicotianaminsynthase (NAS) aus *A. thaliana* der Zn^{2+}-sensitive Phänotyp der Mutante komplementiert werden. Damit wurde gezeigt,

dass die konstitutiv höhere Expression des *NAS*-Gens, die erhöhte Proteinmenge der NAS und ein erhöhter NA-Gehalt zur Zn^{2+}-Hyperakkumulation und Hypertoleranz in *A. halleri* beitragen.

1.8 *Arabidopsis halleri* als Modellsystem zur Untersuchung der Schwermetalltoleranz und Schwermetallhomöostase

Von besonderem Interesse für Untersuchungen zur Schwermetalltoleranz und- homöostase ist die Brassicaceae *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz (= *Cardaminopsis halleri* (L.) Hayek). *A. halleri* wird der Schwermetallpflanzengesellschaft des *Armerietum halleri* zugeordnet (Ernst, 1974) und ist schon seit langem als Zn^{2+}-Hyperakkumulator bekannt (Baker und Brooks, 1989; Macnair *et al*., 1999; Bert *et al*., 2000; Zhao *et al*., 2000; Sarret *et al*., 2002). Sie kommt in Gebieten mit erhöhten Zn-, Pb- und Cd-Gehalten im Boden vor (Ernst, 1974) und wird deshalb auch als Indikatorpflanze zur Detektion von Schwermetallkontaminationen im Boden genutzt (Bert *et al*., 2000). Da *A. halleri* nicht nur auf schwermetallbelasteten Standorten zu finden ist, wird sie auch als Pseudometallophyt bezeichnet (Bert *et al*., 2000).

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass *A. halleri* nicht nur Zn^{2+} sondern auch Cd^{2+} hyperakkumuliert (Dahmani-Müller *et al*., 2000; Küpper *et al*., 2000; Bert *et al*., 2002; Macnair, 2002). Interessanterweise zeigten Kreuzungsexperimente zwischen *A. halleri* und der nicht toleranten und nicht hyperakkumulierenden Art *Arabidopsis lyrata ssp. petraea*, dass die Merkmale der Zn^{2+}- und der Cd^{2+}-Hyperakkumulation genetisch voneinander unabhängig sind. Das Gleiche gilt für die Merkmale der Zn^{2+}- und der Cd^{2+}-Hypertoleranz (Macnair *et al*., 1999; Bert *et al*., 2003).

Die enge verwandtschaftliche Beziehung zu *A. thaliana* (Koch *et al*., 1999) macht *A. halleri* zu einem idealen Modellsystem für Untersuchungen zur Schwermetalltoleranz /-hyperakkumulation und -homöostase. So ist es möglich, durch Vergleiche mit dem vollständig sequenzierten Genom von *A. thaliana* (The *Arabidopsis* Initiative, 2000), Aussagen zu möglichen Funktionen isolierter Gene oder Genfragmente aus *A. halleri* zu treffen. Gleichzeitig können zu untersuchende Gene oder Genfragmente aus *A. halleri* relativ unkompliziert in *A. thaliana* mittels gut etablierter genetischer Werkzeuge charakterisiert werden. Dazu zählen ein effizientes Transformationssystem (Clough und Bent, 1998), T-DNA-Insertionslinien (Sussman *et al*., 2000) oder Mikroarrays.

1.8 Anliegen der Arbeit

Über die molekularen Mechanismen, die der Schwermetalltoleranz, -hyperakkumulation und der Schwermetallhomöostase zu Grunde liegen, ist in Pflanzen wenig bekannt. In *A. halleri* wurde für die Merkmale der Schwermetalltoleranz und –hyperakkumulation gezeigt, dass es sich um konstitutiv ausgeprägt Merkmale handelt.

Ein Anliegen der Arbeit war es, Gene in *A. halleri* zu identifizieren, die an der Ausprägung dieser Merkmale beteiligt sind. Dazu sollten die Methode des cDNA-AFLP sowie cDNA-Mikroarrays benutzt werden. Mit Hilfe des „cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism" (cDNA-AFLP) sollten durch Schwermetallstress differentiell regulierte Gene identifiziert werden. Der Vergleich

der Regulation dieser Gene mit *A. thaliana* nach Schwermetallbehandlung, sollte mögliche Kandidaten identifizieren. Mit Hilfe von vergleichenden Mikroarrayanalysen zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* sollten Transporter identifiziert werden, die möglicherweise zur erhöhten Toleranz bzw. die Hyperakkumulation von Schwermetallen in *A. halleri* beitragen.

Da über eine schwermetallspezifische Signaltransduktion in Pflanzen wenig bekannt ist (Clemens, 2001), war es von großem Interesse, schwermetallregulierte Gene aus *A. halleri* mit möglichen Signaltransduktionseigenschaften zu isolieren. Dafür sollte ebenfalls die Methode des cDNA-AFLP benutzt werden. Die korrespondierenden Gene der erhaltenen differentiell exprimierten cDNA-Fragmente sollten anschließend in den verwandten Arten *A. halleri* und *A. thaliana* transkriptionell charakterisiert werden. Eine Auswahl schwermetallinduzierter, putativer Signaltransduktionskomponenten sollte anschließend in *A. thaliana* mittels T-DNA-Insertionslinien und/oder biochemischen Methoden auf ihre Funktion für die Schwermetallhomöostase überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide

Alle verwendeten Laborchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Steinheim) bezogen. Organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Riedel-de-Haen (Hannover), Fluka und Merck bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien wurden von Difco Lab. (USA), Merck und Duchefa (Niederlande) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten kamen von Eurogentec (Belgien), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), NEB (Frankfurt/Main) und Promega (USA). Radiochemikalien, wie α-[^{32}P]-dATP, α-[^{33}P]-dATP, γ-[^{32}P]-ATP und γ-[^{33}P]-ATP wurden von ICN Pharmaceuticals (USA) geliefert. Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg), Metabion (Martinsried) oder Sigma-Ark (Darmstadt) synthetisiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und die entsprechenden PCR-Bedinungen sind im Anhang A aufgeführt. Autoradiogramme wurden mittels eines Storm II PhosphoImagers der Firma Molecular Dynamics (Krefeld) oder mit Hilfe von Röntgenfilmen der Firma Kodak (bezogen über Amersham Biosciences, Freiburg) aufgenommen.

2.1.2 Medien

Tab. 2-1. Herstellung häufig verwendeter Medien

Medium	Zusammensetzung / Herstellung
LB	10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl; autoklavieren
YEB	5 g Rinder-Extrakt, 1 g Hefe-Extrakt, 1 g Pepton, 5 g Saccharose, 2 mM $MgCl_2$; autoklavieren
Gamborgs B5	Makroelemente: 0,134 g $(NH_4)SO_4$, 0,113 g $CaCl_2$, 0,122 $MgSO_4$, 2,5 g KNO_3, 0,131 g $NaHPO_4$ Fe-EDTA: 27,8 mg $FeSO_4$, 37,7 mg Na_2EDTA Mikroelemente: 3 mg H_3BO_3, 25 µg $CoCl_2$, 25 µg $CuSO_4$, 10 mg $MnSO_4$, 0,25 mg Na_2MoO_4, 0,75 mg KJ, 2 mg $ZnSO_4$; pH 5,7
1 MS	Makroelemente: 1,9 g KNO_3, 1,65 g NH_4NO_3, 0,44 g $CaCl_2$, 0,37 g $MgSO_4$, 0,17 g KH_2PO_4 Fe-EDTA: 27,8 mg $FeSO_4$, 37,7 mg Na_2EDTA Mikroelemente: 19,9 mg $MnSO_4$, 8,6 mg $ZnSO_4$, 6,3 mg H_3BO_3, 0,83 mg KJ, 0,25 mg Na_2MoO_4, 25 µg $CuSO_4$, 25 µg $CoCl_2$ Vitamine: 0,1 g myo-Inositol, 0,5 g Nikotinsäure, 0,5 g Pyridoxin-HCl, 0,1 g Thiamin-HCl 10 g Saccharose, pH 5,7

Medium	Zusammensetzung / Herstellung
Hoagland	Makroelemente: 0,28 mM $Ca(NO_3)_2$, 0,1 mM $(NH_4)PO_3$, 0,2 mM $MgSO_4$, 0,6 mM KNO_3 Eisen: 0,5 µM FeHBED (Chaney, 1988) Mikroelemente: 0,03 µM $CuSO_4$, 0,08 µM $ZnSO_4$, 0,5 µM $MnCl_2$, 4,6 µM H_3BO_3, 0,01 µM MoO_3, pH 5,7

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen. Um LB-Platten und YEB-Platten herzustellen, wurden zusätzlich 15 g Bacto-Agar/Liter Medium zugesetzt. Für MS-Festmedium wurden 7,5 g Bacto-Agar/Liter zugesetzt.

2.1.3 Vektor-Plasmide und Bakterienstämme

Folgende Klonierungsvektoren und Wirtsbakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tab. 2-2. Vektor-Plasmide und Bakterienstämme

Plasmid-Vektor	wesentliche Merkmale	Referenz
pGEM®-T	f1 ori, *col*E1 ori, *lac*Z, MCS, Amp^r, SP6- und T7-Promotor	Promega, USA
pRT100	*col*E1 ori, MCS, Amp^r, CaMV-35S-Promotor und -Poly(A)-Signal	(Töpfer *et al*., 1987)
pCB302	RK2 ori, *npt*III, MCS1, MCS2, Tnos-Promotor-bar-Pnos-Terminator	(Xiang *et al*., 1999)
Baterienstamm	**wesentliche Merkmale**	**Referenz**
DH5α™	F-, ϕ80d*lac*ZΔM15, Δ(*lac*ZYA-*arg*F), U169, *deo*R, *rec*A1, *end*A1, *hsd*R17(r_k^-, m_k^+), *pho*A, *sup*E44, λ^-, *thi*-1, *gyr*A96, *rel*A1	Invitrogen, Karlsruhe
Agrobacterium Stamm GV3101 (pMP90)	Gm^r, Rif^r	(Koncz und Schell, 1986)

2.2 Kultivierung und Behandlung von Pflanzen

2.2.1 Pflanzenmaterial

Für Experimente mit *Arabidopsis thaliana* wurde entweder der Ökotyp Col-0 oder Wassilewskija (WS) benutzt. *Arabidopsis halleri*-Pflanzen und -Samen wurden auf der zink- und kupferhaltigen mittelalterlichen Schlackenhalde Bredelem, bei Langelsheim (10°20‘35‘‘ östliche Länge, 51°57‘58‘‘ nördliche Breite) gesammelt. Neben Zink und Kupfer gehört auch Blei zu den dominierenden Metallen an diesem Standort (Ernst, 1974; Mohr, 1978).

2.2.2 Pflanzenanzucht

Um bei *Arabidopsis halleri* einen identischen genetischen Hintergrund zu schaffen, wurden alle verwendeten Pflanzen aus einer Mutterpflanze über Stecklinge vermehrt.

Das Kultursubstrat zur Anzucht setzte sich aus einem Gemisch gleicher Teile Erde und Sand, bzw. Vermiculite (2 - 3 mm Körnung, Marmullar, Witten) zusammen. Die Anzucht erfolgte bei 22°C und einer Lichtstärke von 250 µmol/m^2s in klimatisierten Phytokammern (Percival Scientific, bezogen über CLF Laborgeräte, Emersacker). Kurztag-Bedingungen (8 h Tag/16 h Nacht) dienten im Falle von *Arabidopsis thaliana* für vegetatives Wachstum und Langtag-Bedingungen (16 h Tag/8 h Nacht) für generatives Wachstum. Für die Anzucht von *Arabidopsis halleri* wurden ausschließlich Langtag-Bedingungen gewählt.

Suspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* wurden in Gamborgs B5-Medium (Kap. 2.1.2) im Dunkeln bei 26°C geschüttelt und alle 7 Tage in frisches Medium überführt (Trezzini *et al*., 1993).

Anzucht in Flüssigmedium

Pflanzen wurden aus sterilen Samen für 14 Tag im Dauerlicht unter Schütteln (50 rpm) bei 22°C in 50 ml 1 MS-Medium (Kap. 2.1.2) angezogen.

Anzucht in hydroponischen Kulturen

Je ein steriler Same wurden in ein mit 0,5%-iger (w/v) Agarose (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf)gefülltes 200 µl PCR-Reaktionsgefäß (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) gelegt, das am unteren Ende abgeschnitten war. Bei Stecklingen wurde auf die Agarose verzichtet. Die Keimung/Anzucht erfolgte in einem an der Oberseite lichtdurchlässigen, mit Hoagland-Medium gefüllten, abgeschlossenen Behälter. Nach 14 Tagen wurden die jungen Pflanzen in lichtundurchlässige, geschlossene, mit 1,5 l Hoagland-Medium gefüllte Hydrokulturtöpfe (Dehner Garten-Center, Rain am Lech) überführt. Das Medium wurde einmal pro Woche gewechselt.

2.2.3 Oberflächensterilisierung von Samen

Zur Sterilisierung wurden die Samen in 70%-igem (v/v) Ethanol vorinkubiert. Nach 2 min wurde der Alkohol gegen eine Sterilisationslösung (12% (v/v) Na-Hypochlorit, 0,2% (v/v) Tween® 20) ausgetauscht. Samen von *A. thaliana* wurden für 5 min und von *A. halleri* für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Samen fünfmal in sterilem Wasser gewaschen.

2.2.4 Stressbehandlung der Pflanzen

In Flüssigkulturen erfolgte die Applikation der Schwermetalle entweder einzeln oder als Gemisch direkt in das Medium. Im hydroponischen System erfolgte die Stressapplikation 24 h nachdem das Medium gewechselt wurde. Die Pflanzen wurden dann in einen Topf überführt, in dem die gewünschte Bedingung eingestellt waren. Teilweise erfolgte die Applikation von Stressfaktoren durch ein Flottieren von Blättern in wässriger Lösung (0,5 g/l MES, pH 5,7) nach 24-stündiger Vorinkubation.

Nach Ende der Behandlung wurde das überschüssige Medium entfernt und das Material in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.2.5 Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte durch die „floral dip"-Methode (Clough und Bent, 1998). Dazu wurde eine 200 ml Übernachtkultur in YEB-Medium des mit einem binären Vektor transformierten *Agrobacterien*-Stammes (Kap. 2.3.2.1) bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei 28°C unter Schütteln in Anwesenheit von 50 mg/l Rifampicin, 25 mg/l Gentamycin und 50 mg/l Kanamycin angezogen, abzentrifugiert (10 min, 16°C, 800 x *g*) und in 200 ml Infiltrationslösung (0,5% (w/v) Saccharose und 0,05% (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)) resuspendiert. Die Blütenstände von unter Langtag-Bedingungen angezogenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für 30 s in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen 24 h hoher Luftfeuchtigkeit ausgesetzt, bevor sie unter normalen Bedingungen Samen bildeten.

2.3 Bakterien

2.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* DH5α-Zellen erfolgte bei 37°C in LB-Medium oder auf LB-Platten unter Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 50 mg/l Kanamycin, wobei Flüssigkulturen bei 160 rpm geschüttelt wurden.

2.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit Hilfe der $CaCl_2$-Methode (Ausubel *et al*., 1989) hergestellt. Aus einer Vorkultur wurden in 200 ml LB-Medium DH5α-Zellen angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,4–0,6 wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10 min, 4°C, 800 x *g*) und das Pellet in 10 ml kaltem 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 4°C, 800 x *g*) und in 100 mM $CaCl_2$ und 15 % (v/v) Glyzerin resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

2.3.1.2 Transformation von *E. coli*

Nach dem Auftauen wurden die kompetenten DH5α-Zellen für 30 min auf Eis mit Plasmid-DNA inkubiert, 60 s auf 42°C erhitzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Ansatz 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, pelletiert (3 min, RT, 800 x *g*), in 100 µl frischem LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.3.2 Kultivierung von *A. tumefaciens*

Die Anzucht des GV3101-Stammes erfolgte bei 28°C in YEB-Medium bzw. auf YEB-Platten unter Zusatz von 50 mg/l Rifampicin und 25 mg/l Gentamycin. Flüssigkulturen wurden bei 160 rpm geschüttelt.

2.3.2.1 Transformation von *A. tumefaciens*

Aus einer Vorkultur wurde eine 50 ml Kultur bei 28°C bis zu einer von OD_{600} von 0,8 kultiviert. Nach Zentrifugation (5 min, 4°C, 800 x *g*) wurden die Zellen in 1 ml eisgekühltem 20 mM $CaCl_2$ resuspendiert, aliquotiert und auf Eis gelagert. 1 µg Plasmid-DNA wurde zugegeben und der Ansatz in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C wurde 1 ml YEB-Medium zugegeben und 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (5 min, RT, 800 x *g*), in 0,1 ml YEB aufgenommen und auf YEB-Platten (50 mg/l Rifampicin, 25 mg/l Gentamycin, 50 mg/l Kanamycin) ausplattiert und für 2 d bei 28°C kultiviert.

2.4 Nukleinsäureanalytik und Herstellung rekombinanter DNA

Molekularbiologische Standardmethoden, die im folgenden nicht einzeln erwähnt sind, wurden wie in (Sambrook *et al*., 1989) beschrieben, durchgeführt.

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde aus etwa 100 mg Pflanzenmaterial nach der TRIZOL®-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert.

Das gefrorene und gemörserte Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml TRIZOL®-Reagenz (0,8 M Guanidiumthiozyanat, 0,4 M Ammoniumthiozyanat, 0,1 M Na-Azetat 5% (v/v) Glyzerin, 38% (v/v) Phenol, pH 5,0) homogenisiert und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Nach 15 min Zentrifugation (12.000 x *g*, 4°C) wurde die RNA aus der oberen wässrigen Phase mit 1 Vol. Isopropanol bei RT gefällt, präzipitiert (15 min, 4°C, 12.000 x *g*) und mit 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 - 50 µl Wasser aufgenommen.

2.4.2 DNA-Isolierung

2.4.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Schnell-Präparation genomischer DNA für PCR

Eine mit einem 1,5 ml Reaktionsgefäß ausgestanzte Blattscheibe wurde mit 500 µl Extraktionspuffer (0,2 M Tris-HCl, 0,4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 9,0) homogenisiert und 5 min bei RT zentrifugiert (12.000 x *g*). 350 µl des Überstandes wurden mit 1

Vol. Isopropanol präzipitiert (10 min, RT, 12.000 x *g*). Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 400 µl TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst.

Isolierung reiner genomischer DNA

Gemörsertes Blattmaterial wurde mit 0,55 ml Extraktionspuffer (siehe oben) und 1 Vol. Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol, 25:24:1, (v/v/v) versetzt und zentrifugiert (5 min, 12.000 x *g*, 4°C). Nach wiederholter Phenol-Extraktion wurde der wässrige Überstand mit 0,8 Vol. Isopropanol präzipitiert (10 min, RT, 12.000 x *g*) und anschließend luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 400 µl TNE-Puffer (0,01 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) und 2 µl RNase A (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Phenol-Extraktion wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1,5 Vol. Isopropanol gefällt, zentrifugiert (10 min, RT, 12.000 x *g*) mit Alkohol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE resuspendiert.

2.4.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Mini-Präparation

2 ml Übernachtkulturen in LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, wurden zentrifugiert (5 min, RT, 800 x *g*) und in 250 µl Lösung I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS), 350 µl Lösung III (3 M Kaliumazetat, pH 4,8) und 200 µl Chloroform wurde aus der wässrigen Phase die DNA mit 1 Vol. Isopropanol präzipitiert (10 min, 4°C 12.000 x *g*), in 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert.

Plasmid-DNA, die sequenziert werden sollte, wurde mittels des „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert.

Midi-Präparation

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des „QIAfilter™ Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

Präparation von Plasmid-DNA aus A. tumefaciens

2 ml Übernachtkulturen wurden nach Zentrifugation (3 min, RT, 800 x *g*) einmal gewaschen (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0) und in 400 µl Lösung 1 (10 mM Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 1mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chlorophorm (1:1 (v/v), äquilibriert mit 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8,0) wurde die wässrige Phase mit 2 Vol. absolutem Ethanol gefällt und das Präzipitat mit 80%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE resuspendiert.

2.4.2.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Ausschneiden des DNA-Fragmentes unter UV-Licht erfolgte die Elution des Fragmentes mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll.

2.5 FRDD-Experiment (Bachem *et al*., 1996; Habu *et al*., 1997)

Aus *A. halleri*-Flüssigkulturen, die mit einem Gemisch aus Schwermetallen (100 µM $CdCl_2$, 500 µM $ZnCl_2$, 500 µM $CuSO_4$) behandelt und nach 0 h (unbehandelte Kontrolle), 2 h, 8 h und 24 h geerntet wurden, wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben Gesamt-RNA isoliert und in 44 µl Wasser gelöst. Anschließend erfolgte eine DNase-Behandlung in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 1x DNase-Puffer (Boehringer, Mannheim) und 5 U RNase-freier DNase (Boehringer, Mannheim) für 15 min bei 37°C. Nach Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1 (v/v), äquilibriert mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 M NaCl), wurde die wässrige Phase mit 2 Vol. absolutem Ethanol gefällt und die RNA mit 80%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl Wasser resuspendiert. Für die weiteren Schritte wurde1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und erfolgten mit Hilfe des „displayProfile™ Kit“ (Display Systems Biotech, Dänemark) wie im Herstellerprotokoll beschrieben.

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mittels einer Sequenzier-Gelelektrophorese (Kap. 2.6). Die Isolierung, Elution und Reamplifikation von Fragmenten mit differentiellem Bandenmuster erfolgte nach Herstellerangaben.

2.6 cDNA-AFLP-Experiment (Bachem *et al*., 1996; Durrant *et al*., 2000)

Aus Triplikaten von *A. halleri*-Flüssigkulturen, die mit einem Gemisch aus Schwermetallen (100 µM $CdCl_2$, 500 µM $ZnCl_2$, 500 µM $CuSO_4$) behandelt und nach 0 h (unbehandelte Kontrolle), 2 h, 8 h und 24 h geerntet wurden, wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben, Gesamt-RNA isoliert.

Isolierung von Poly(A)$^+$-RNA

150 µg Gesamt-RNA wurden in 200 µl Wasser gelöst und mit 200 µl (1 mg) äquilibrierten Dynabeads® (Dynal, Norwegen) gemischt. Anschließend wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Reverse Transkription und Zweitstrangsynthese

Die gesamte Poly(A)$^+$-RNA wurde in einem 20 µl Ansatz mit Hilfe des „First Strand Synthesis Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers zu einzelsträngiger cDNA umgeschrieben. Für 2 h bei 16°C in einem Volumen von 40 µl erfolgte die Zweitstrangsynthese nach Zugabe von 1x Zweitstrangpuffer (35 mM TrisHCl, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM $(NH_4)SO_4$, 3 mM DTT, pH 7,4), 1 mM dNTPs (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) und 5 U DNA Polymerase I (Invitrogen, Karlsruhe). Danach wurde das Volumen auf 200 µl aufgefüllt und mit Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol, 25:24:1, (v/v/v) extrahiert. Die wässrige Oberphase wurde mit 0,1 Vol. 5 M Na-Azetat, pH 5,2 und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt, zentrifugiert (15 min, 4°C, 12.000 x g), in 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Verdau und Adapterligation

10 µl der doppelsträngigen cDNA wurden in 1x NEB3-Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, pH 7,9), 0,1 mg/ml BSA und 25 U *Taq*I-Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 40 µl für 2 h bei 65°C gespalten. Die anschließende *Apo*I-Restriktionsendonukleasebehandlung erfolgte nach Zugabe von 5 U *Apo*I, in 1x NEB3-Puffer und

0,1mg/ml BSA in einem Volumen von 50 µl für 2 h bei 50°C. Nach Erhitzen der TaqI- und ApoI-Adapteroligonukleotidprimer (Sequenzen siehe Anhang C) in equimolaren Mengen für 5 min auf 95°C und anschließendem Abkühlen auf RT, wurde die Ligation in 1x NEB3-Puffer, 0,2 mM ATP (MBI Fermentas, St. Leon-Roth), 5 pmol *Apo*I-Adapter, 50 pmol *Taq*I-Adapter sowie 5 U T4 DNA Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) für 3 h bei 37°C durchgeführt.

Amplifikation des primären Templates

20 µl der adapterligierten cDNA-Fragmente wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% (v/v) Triton X-100, pH 9,0), je 100 ng nicht-selektiven Apo+0- und Taq+0-Primer, 0,28 mM dNTPs und 0,5 µl *Taq*-/*Pfu*-DNA-Polymerase-Mix (1 U *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, USA) auf 160 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, USA)) mittels PCR (20 Zyklen: 30 s bei 94°C, 30 s bei 52°C und 1 min bei 72°C) amplifiziert und anschließend 1:10 verdünnt.

Kinatisierung der selektiven Apo-Primer

Die radioaktive Markierung der selektiven Primer erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 25 µl für 30 min bei 37°C mit folgenden Substanzen: 50 ng des selektiven Apo-Primers, 1x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (Promega, USA), 50 µCi γ-[^{33}P]-ATP und 2,5 U T4 Polynukleotidkinase (Promega, USA). Nach Hitzeinaktivierung (10 min, 95°C) wurde der Ansatz bei –20°C bis zur Verwendung gelagert.

Selektive Amplifikation

1 µl der 1:10 verdünnten, voramplifizierten cDNA-Fragmente wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in 1x PCR-Puffer, 1 ng γ-[^{33}P]-ATP-markiertem, selektivem Apo-Primer, 30 ng selektiven Taq-Primer, 5 mM dNTPs und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, USA) mit 10 µl Chill-Out-Wax (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) überschichtet und mit Hilfe einer „Touchdown"-PCR (13 Zyklen: 30 s bei 94°C, 30 s bei 65°C (Reduktion der Temperatur pro Zyklus um 0,7°C), 60 s bei 72°C, gefolgt von 22 Zyklen: 30 s bei 94°C, 30 s bei 56°C und 60 s bei 72°C) amplifiziert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Ladepuffer (95% (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenol-Blau, 0,05% (w/v) Xylencyanol-Gelb) gemischt und bis zur Analyse bei –20°C gelagert.

Sequenzier-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff, 5% (v/v) Acrylamid/N, N'-Methylenbisacrylamid (19:1, Roth, Darmstadt), 1x TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0)) mit Hilfe des BRL S2-Elektrophoresesystems (Invitrogen, Karlsruhe). 4 µl des Ansatzes aus der selektiven Amplifikation wurden aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 1800 V mit 1x TBE Puffer für ca. 2 h. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier (3 MM, Whatman, England) aufgezogen und bei 80°C 2 h vakuumgetrocknet. Die Autoradiographie erfolgte über Nacht oder bis zu drei Tagen durch Auflegen von BioMax MR Röntgenfilmen (Amersham Bioscience, Freiburg).

Elution, Reamplifikation und Klonierung der DNA-Fragmente

Differentiell exprimierte Fragmente wurden mit Stecknadeln auf dem übereinander gelegten Röntgenfilm und getrockneten PAA-Gel markiert und ausgeschnitten. Das korrekte Ausschneiden

wurde durch eine erneute Autoradiografie überprüft. Das Lösen der DNA aus dem Gelstück erfolgte durch Zugabe von 50 µl TE für 10 min bei 95°C oder wahlweise über Nacht bei 37°C. Um das Fragment zu reamplifizieren wurde in einem Volumen von 50 µl eine PCR-Reaktion mit 20 µl eluiertem Fragment, je 100 ng Apo+0- und Taq+0-Primer, 1x PCR-Puffer, 0,2 mM dNTPs und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, USA) über 30 Zyklen (30 s bei 94°C, 30 s bei 55°C und 60 s bei 72°C) durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde auf einem 2%-igem (w/v) Agarosegel überprüft. 7 µl des amplifizierten PCR-Produktes wurden direkt zur Klonierung in einer 10 µl Reaktion in den „TA-Cloning-Vector" pGEM®-T (Promega, USA) nach Herstellerprotokoll eingesetzt.

2.7 Agarose-Gelelektrophorese

2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von linearen DNA-Molekülen wurden Agarosekonzentrationen von 0,8% - 2% (w/v) in 1x TAE (40 mM Tris-HCl, 20 mM Na-Azetat, 1 mM EDTA, pH 7,0; 50 ng/ml Ethidiumbromid) gewählt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE verwendet. Die DNA wurde mit 0,2 Vol. Ladepuffer (50% (v/v) Glyzerin, 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) Orange G) gemischt und aufgetragen. Als Größenstandard dienten mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) gespaltene λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) und die „GeneRuler™ 1 kb ladder" bzw. „GeneRuler™ 100 bp ladder" (beide MBI Fermentas, St. Leon-Roth). Die angelegte Spannung lag je nach Elektrophoresekammer zwischen 30 V und 160 V. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators (λ = 254 nm) und einer Videokamera dokumentiert.

2.7.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von RNA wurde ein denaturierendes Agarosegel (1,2% (w/v) Agarose, 1x MEN-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Azetat, 1 mM EDTA, pH 7,0), 6% (v/v) Formaldehyd) verwendet. Je 10 - 20 µg Gesamt-RNA wurden mit 1,5 Vol. RNA-Probenpuffer (50% (v/v) Formamid, 6% (v/v) Formaldehyd, 6% (v/v) Glyzerin, 1x MEN-Puffer, 0,04% (w/v) Bromphenolblau) für 10 min auf 65°C erhitzt, 5 min auf Eis abgekühlt und mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 60 V in 1x MEN-Laufpuffer durchgeführt. Als Längenstandard bei der Dokumentation auf dem UV-Transilluminator (λ = 254 nm) diente ein Lineal.

2.8 Transfertechniken und radioaktive Hybridisierung

2.8.1 Northern Transfer

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde die RNA mittels Kapillar-Blot auf eine Hybond-N-Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) überführt. Als Transferpuffer diente 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitrat, pH 7,5). Nach erfolgtem Kapillartransfer (über Nacht) wurde die RNA durch UV-Licht (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

2.8.2 Southern Transfer

PCR-Fragmente und restriktionsendonukleasebehandelte genomische DNA wurden über ein Agarosegel (Kap. 2.7.1) aufgetrennt und mittels alkalischem Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Dazu wurde das Gel für zweimal 10 min in 0,25 N HCl geschwenkt und anschließend für 20 min in 0,4 NaOH neutralisiert. Als Transferpuffer diente 0,4 N NaOH. Der Transfer war nach 2 h abgeschlossen und die Membran wurde in 2x SSC gewaschen, bevor die kovalente Bindung der DNA durch UV-Licht (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg) erfolgte.

2.8.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Um radioaktive DNA-Sonden für DNA- und RNA-Hybridisierungs-Experimente zu erhalten, wurden 25-50 ng gereinigtes DNA-Fragment (Kap. 2.4.2.3) mit 50 µCi α-[^{32}P]-dATP durch den „Megaprime-DNA labelling kit“ (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben markiert. Die Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide erfolgte unter Verwendung von „Probe Quant™ G-50 Micro Columns“ (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Sonde für 10 min bei 95°C denaturiert und sofort verwendet.

2.8.4 Radioaktive Hybridisierung

Die radioaktive Hybridisierung der membrangebundenen Nukleinsäuren erfolgte unter ständiger Rotation bei 65°C in Hybridisierungsöfen. Dazu wurde die Membran in Hybridsierungröhren überführt. Nach der Vorhybridisierung für 2 h in 20 ml Hybridisierungpuffer (0,5 M $NaHPO_4$, 1% (w/v) BSA, 1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS, pH 7,2), wurde die Vorhybridisierungslösung durch 20 ml Hybridisierungspuffer, der die radioaktiv markierte DNA-Sonde (Kap. 2.7.4) enthielt, ausgetauscht und für mindestens 12 h hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran einmal 5 min bei RT in 2x SSC und zweimal für 20 min bei 65°C in einer Waschlösung (0,1x SSC, 0,1% (w/v) SDS) gewaschen. Die Membran wurde dann in Plastikfolie eingeschlagen und auf einem „Phospho Screen“ (Molecular Dynamics, Krefeld) exponiert, der nachfolgend am „Phospho Imager“ (Molecular Dynamics, Krefeld) ausgewertet wurde.

2.9 PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen wurden PE9700- (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und „DNA Engine PTC-200"-„Thermocycler" (MJ Research, USA) eingesetzt. In der Regel wurde Plasmid-DNA oder Bakterienkolonien, 0,5 µM der jeweiligen Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang A), 0,4 mM dNTPs, 1x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% (v/v) Triton-X-100, pH 9,0) und 1-5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, USA) in einem Reaktionsvolumen von 20-50 µl eingesetzt. Nach einer Denaturierungsphase (95°C) von 2,5 min folgte für jedes Primerpaar eine spezifischen Anzahl von Zyklen (siehe Anhang A). Ein Zyklus setzte sich aus einer Denaturierungsphase (94°C, 15 sec), einer Hybridisierungsphase (Temp. siehe Anhang A, 30 sec) und einer Polymerisationsphase (72°C, 30 s - 240 sec) zusammen. Anschließend wurde die Polymerisation bei 72°C für 7 min fortgesetzt und die Reaktion auf 4°C gekühlt.

2.10 RT-PCR

Die reverse Transkription von $PolyA^+$-RNA und anschließende Amplifikation der cDNA zur Analyse der Transkriptakkumulation erfolgte mittels RT-PCR. Die reverse Transkription erfolgte aus 1 µg Gesamt-RNA mit Hilfe des „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit" (MBI Fermentas, St Leon-Roth). 1 µl cDNA wurde anschließend in der PCR (Kap. 2.8) eingesetzt.

2.11 RACE-Reaktion

Die Amplifikation der 3'- und 5'-Enden der cDNA wurde mit dem „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit" (Clontech, USA) nach Herstellerangaben aus *A. halleri*-Gesamt-RNA (Kap. 2.4.1) durchgeführt. Die verwendeten RACE-Oligonukleotidprimer sind in Anhang A aufgelistet.

2.12 DNA-Sequenzierung

2.12.1 Automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden mit dem „SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing Kit" (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) oder dem „ThermiSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit" (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Auftrennung und Analyse der Sequenzreaktion erfolgte mit einem DNA-Sequenzierautomaten LICOR 4000L bzw. Longreader 4200 (MWG Biotech, Ebersberg).

2.12.2 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte durch die Programme EditSeq, MapDraw, SeqMan II und Protean (DNA-Star Inc., USA). Sequenzvergleiche mit Datenbanken erfolgte mit Hilfe des „BLAST"-Algorithmus (Altschul *et al*., 1990; 1997).

2.13 Makroarray-Experimente

Die DNA-Fragmente für die Makroarrays stammten hauptsächlich aus der cDNA-AFLP-Analyse (Kap. 2.5; Anhang D) oder waren mittels RT-PCR analysierte und anschließend in den pGEM®-T-Vektor klonierte Genfragmente (siehe Anhang A). Die cDNA-AFLP-Fragmente wurden mittels Apo+0- und Taq+0-Primern, die anderen Genfragmente mit vektorspezifischen T7- und SP6-Primern (Sequenzen siehe Anhang A und C) amplifiziert. Die Abtrennung der Nukleotide und der Primer erfolgte mittels MultiScreen$_{96}$-PCR Filter Platten (Millipore, Eschborn) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 30 µl TE eluiert und die Qualität auf einem 2%-igem (w/v) Agarosegel überprüft. Die Proben wurden anschließend 1:2 und 1:5 verdünnt. Das Aufbringen der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran (Biodyne B, Pall, England) erfolgte durch den „Mikro GridII"-DNA-Spotter (BioRobotics, bezogen über GeneScan, Freiburg). Die durchschnittliche Größe eines Punktes betrug 400 µm. Die unverdünnte Probe und die Verdünnung wurden jeweils vier Mal in einem 3x4 Raster gespottet. Der Filter wurde nachfolgend für zweimal 5 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), zweimal 5 min in Neutralisierungslösung (1M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) und für 5 min mit 2x SSC behandelt, getrocknet und durch UV-Licht (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg) auf dem Filter fixiert.

Präparation der Sonde

10 µg Gesamt-RNA (Kap. 2.4.1) wurden mit dem „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Reaktionsvolumen von 40 µl zu cDNA nach Herstellerangaben umgeschrieben. Nicht eingebaute Nukleotide wurden unter Verwendung von „Probe Quant™ G-50 Micro Columns" (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit 50 µCi α-[^{33}P]-dATP wie in Kap. 2.7.4 beschrieben.

Auswertung der Daten

Die Evaluierung der Hybridisierungssignale auf den einzelnen Filtern erfolgte mit Hilfe der „AIDA Image Analyzer" Software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt). Um jeden Hybridisierungspunkt wurden im Abstand von 100 µm zwei Kreise gelegt, aus denen die Hintergrundintensität ermittelt wurde. Hybridisierungsartefakte und diffuse Hybridisierungsbereiche wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Für die Auswertung wurden die Rohdaten nach Microsoft Excel exportiert. Nach der Subtraktion des Hintergrundes wurden alle Werte, deren Intensität kleiner als 20 waren, auf den Wert 20 gesetzt (Hoffmann *et al*., 2002). Die Normalisierung der einzelnen Filter erfolgte über einen Vergleich konstitutiv exprimierter Gene. So wurde für jeden Filter ein Normalisierungsfaktor ermittelt, durch den die Daten dividiert wurden (Winzeler *et al*., 1999). Anschließend wurde für jede Verdünnung eines DNA-Fragments das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt. Eine erste Qualitätsprüfung ergab sich

aus der Ermittlung der Steigung aus den Verdünnungen und den entsprechenden Mittelwerten. Nur bei positiver Steigung (≥ 100) wurde das Fragment weiter analysiert. Eine weitere Qualitätsprüfung erfolgte durch die Analyse des Verhältnisses zwischen Signal und Hintergrund. Hierbei wurden die arithmetischen Mittel der Signalintensitäten der einzelnen Verdünnungen und deren korrespondierende Hintergründe gemittelt und ins Verhältnis gesetzt. Aus den Verhältnissen ließ sich nun eine Aussage über die Qualität des Signals treffen (Tab. 2-3.).

Tab. 2-3.: Bewertungskriterien für die Qualität eines Signals

Verhältnis (Signal/Hintergrund)	Qualität
< 1	sehr schlecht
< 1,1	schlecht
< 1,2	ausreichend
< 1,25	befriedigend
< 1,5	gut
≥ 1,5	sehr gut

Danach wurden die Werte der einzelnen Verdünnungen eines Signals ins Verhältnis mit den entsprechenden Signalen auf dem Filter gesetzt, der mit Kontrollbedingungen hybridisiert wurde, das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt, und in die folgenden Klassen eingeteilt: induziert (Wert minus Standardabweichung ≥ 2), reprimiert (Wert minus Standardabweichung ≤ 0,5) und unverändert (Wert minus Standardabweichung > 0,5 und < 2).

2.14 Mikroarray-Experimente

2.14.1 ABC-Transporter-Mikroarray

Schwermetallregulierte ABC-Transporter wurden in *A. halleri* und *A. thaliana* mittels Mikroarray-Hybridisierungsexperimenten in Zusammenarbeit mit Dr. Lucien Bovet (Universität Neuchâtel, Schweiz) und Prof. Enrico Martinoia (Universität Zürich, Schweiz) identifiziert. Der Mikroarray enthält u. a. die 3'-Enden von allen Transportern der MRP-Familie sowie 50 ESTs weiterer ABC-Transporter (Bovet *et al*., 2003).

Herstellung der Sonde

10 µg Gesamt-RNA und 5 µg Oligo(dT)$_{12\text{-}18}$ (Invitrogen, Karlsruhe) wurden in 18 µl für 10 min bei 70°C denaturiert, für 5 min auf Eis inkubiert. In einem Reaktionsvolumen von 30 µl wurden der Ansatz zusammen mit 1x Erststrangpuffer (Invitrogen, Karlsruhe), je 0,5 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,1 mM dTTP (MBI Fermentas, St Leon-Roth), 0,4 mM Aminoallyl-dUTP (Sigma, Steinheim), 10 mM DTT, 20 U Rnasin (Invitrogen, Karlsruhe) und 500 U Superscript™II Rnase H$^-$ (Invitrogen, Karlsruhe) für 2 h bei 42°C zu cDNA transkribiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 15 µl 0,1 N NaOH bei 70°C für 15 min degradiert und anschließend mit 15 µl 0,1 N HCl

neutralisiert. Die Abtrennung der nicht-inkorporierten Nukleotide und Aufreinigung des Ansatzes erfolgte nach Zugabe von 450 µl Wasser mit „Microcon-30“ Filterröhrchen (Millipore, Eschborn) durch Zentrifugation bei RT mit 12 x *g* für 7 min. Der Ansatz wurde zweimal mit 450 µl Wasser gewaschen (RT, 12 x *g*, 7 min), auf ein Volumen von 10 µl eingeengt und bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Kopplung der Farbstoffe an die cDNA

Der Ansatz wurde zur Veresterung der Farbstoffe mit 0,5 µl 1 M Natriumbicarbonat, pH 9.0 gemischt und in ein lichtundurchlässiges 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 100 µg „FluoroLink™ Cy3 monofunctional dye“ oder „FluoroLink™ Cy5 monofunctional dye“ (Amersham Biosciences, Freiburg) aliquotiert wurden, erneut durchmischt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4,5 µl 4 M Hydroxylamin (Sigma, Steinheim) und einer Inkubation für 15 min bei RT wurde der Cy5-Ansatz mit dem entsprechenden Cy3-Ansatz gemischt und die nicht-inkorporierten Farbstoffe mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben abgetrennt und zweimal mit 30 µl Elutionspuffer EB (Qiagen, Hilden) eluiert, vereint und vakuumgetrocknet.

Hybridisierung und Waschen der Mikroarrays

Das Pellet wurde in 18 µl „DIG Easyhyb“ (Roche, Mannheim) gelöst, für 2 min bei 100°C und anschließend für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Der Ansatz wurde auf den, mit „DIG Easyhyb“ für 45 min bei 42°C, vorhybridisierte Mikroarray aufgetragen, mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt und in einer Hybridisierungskammer für 14 h bei 42°C im Wasserbad hybridisiert. Der Array wurde zweimal in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,2% (w/v) SDS) für 5 min bei 42°C, zweimal in Waschlösung 2 (0,2 x SSC, 0,2 % (w/v) SDS) für 5 min bei RT, einmal in Waschlösung 3 (0,2x SSC) für 5 min bei RT geschwenkt und anschließend luftgetrocknet.

Analyse und Auswertung

Die Auswertung der Arrays erfolgte mit Hilfe des „ScanArray4000“ (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim). Die primäre Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der „QuantArray™ Analysis Software“ (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim). Die Normalisierung der Arrays erfolgte über den Vergleich konstitutiv exprimierter Gene (Winzeler *et al.*, 1999). Für jeden Kanal wurde aus dem arithmetischen Mittel der Intensitäten der konstitutiven Kontrollen ein Normalisierungsfaktor berechnet, durch den die Intensitäten der übrigen Gene dividiert wurden. Da jedes Gen mindestens zweimal auf dem Array repräsentiert ist, wurde aus den einzelnen Intensitäten das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt und in folgende Klassen eingeteilt: induziert (Wert minus Standardabweichung ≥ 2), reprimiert (Wert minus Standardabweichung $\leq 0{,}5$) und unverändert (Wert minus Standardabweichung $> 0{,}5$ und < 2).

2.14.2 Affymetrix „GeneChip® Arabidopsis Genome Array“

Zur Feststellung der relativen mRNA-Transkripthäufigkeit von mehr als 8.200 *A. thaliana*-Genen und mehr als 100 EST-Klustern wurde der „GeneChip® Arabidopsis Genome Array“ (Affymetrix, USA) verwendet (Zhu *et al.*, 2001).

Herstellung und Vorbereitung der Sonde

Die Herstellung der Sonde erfolgte nach einem modifizierten Herstellerportokoll. 10 µg Gesamt-RNA (Isolation siehe Kap. 2.4.1) und 100 ng T7(dT)$_{24}$-Primer (Ambion, USA) wurden in 10 µl für 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt, zusammen mit 1x Erststrangpuffer (Invitrogen, Karlsruhe), 10 mM DTT und 0,5 mM dNTPs für 2 min bei 42°C und nach Zugabe von 400 U Superscript™II Rnase H$^-$ (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1,5 h bei 42°C inkubiert. Die Zweitstrangsynthese erfolgte in einem Volumen von 130 µl nach Zugabe von 1x „Second Strand Buffer" (Invitrogen, Karlsruhe), 0,23 mM dNTPs, 10 U *E. coli* DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe), 40 U *E. coli* DNA-Polymerase I (Invitrogen, Karlsruhe) und 2 U *E. coli* RNase H (Invitrogen, Karlsruhe) für 2 h bei 16°C. Weitere 20 U T4-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) wurden zugegeben (5 min, 16°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Nach Zugabe von 1 Vol. Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol, 25:24:1, (v/v/v**)** erfolgte die Abtrennung der wässrigen Phase mit „Phase Lock Gel™ Light" Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumazetat und 2,5 Vol Ethanol präzipitiert (30 min, 4°C, 12.000 x *g*), in 80%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3 µl Wasser resuspendiert. Zur Herstellung von Biotin-markierter RNA wurden 1,5 µl des Ansatzes in eine *in vitro*-Transkriptionsreaktion zusammen mit 7,5 mM ATP, 7,5 mM GTP, 0,56 mM CTP, 0,56 mM UTP, 1x T7 Puffermix, 1x T7 Enzymmix (Ambion, USA), 1,88 mM Biotin-11-CTP (Enzo Life Science, USA), 1,88 mM Biotin-16-UTP (Roche Diagnostics, Mannheim) in einem Volumen von 20 µl für 6 h bei 37°C eingesetzt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte durch den „RNeasy® Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die weiteren Schritte, die Quantifizierung der RNA, eine mögliche Aufkonzentrierung und die abschließende Fragmentierung der RNA, sowie die Lagerung erfolgten nach Herstellerangaben.

Hybridisierung und Waschen der Arrays

Die Hybridisierung des GeneChip®-Arrays, sowie alle nachfolgenden Wasch- und Färbeschritte erfolgten in der „GeneChip® Fluidics Station 400" (Affymetrix, USA) nach Angaben des Herstellers für einen Standard Array. Mittels des „GeneArray ® Scanner" (Agilent Technologies, USA) erfolgte die Bestimmung der Intensitäten auf den Arrays.

Analyse und Auswertung

Die primäre Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms „Affymetrix Microarray Suite 4.0" (Affymetrix, USA). Um Unterschiede im Labelling, der Konzentration der einzelnen Sonden oder der Qualität der Hybridisierung auszugleichen, wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Experimente zueinander korrigiert. Die normalisierten Werte für die durchschnittliche Abundanz (AD) eines Transkriptes wurden wie folgt berechnet: nach der Subtraktion des lokalen Hintergrundes wurde für jedes Gen die AD aus dem Mittelwert der Differenz aller „perfect match"-(PM) und „mismatch"-Sonden (MM) ermittelt, nachdem stark abweichende Werte eliminiert wurden. Ein zweiter wichtiger Wert war die „Absolute Decision". Hierbei wurde jedes Transkript einer Kategorie zugeteilt: „present" (P), „absent" (A) oder „marginal" (M). Dieser Wert wurde über

die Anzahl der genspezifischen Hybridisierungspunkte bestimmt, die intensives Hybridisierungssignal zeigten (Affymetrix, 2001).

2.15 Proteinanalytische Methoden

2.15.1 Proteinextraktion

Gefrorenes und gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 Vol. Kinaseextraktionspuffer (25 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 15 mM EGTA, 15 mM Glyzerophosphat, 15 mM 4-Nitrophenylphosphat, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM NaF, 0,5 mM Na_3VO_4, 0,5 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotenin, 0,1% (v/v) Tween® 20, pH 7,8) versetzt, homogenisiert und nach 10 min Inkubation auf Eis zentrifugiert (10 min, 4°C, 12.000 x *g*). Der Überstand wurde direkt weiterverarbeitet oder bei –20°C gelagert.

2.15.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Proteinassay-Reagenz (Pierce, USA) wie im Herstellerprotokoll beschrieben.

2.15.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In „Mighty Small“ und „Sturdier SE 400“ SDS-Gelapparaturen (Hoefer Scientific Instruments, USA) erfolgte die Auftrennung von Proteinen in 10-15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Tab. 2-4.) bei 50 mA. Für die Elektrophorese wurde 1x Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit 1/5 Vol. 5x Probenpuffer (500 mM Tris-HCl, 25% (v/v) Glyzerin, 10% (w/v) SDS, 25% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und aufgetragen. Als Größenstandard diente „Prestained protein Marker, broad range Marker“ (NEB, Frankfurt/Main) und „Prestained SDS-Standards, low range“ (Bio-Rad, München).

Tab. 2-4.: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

Sammelgel (2 ml)			
1,4 ml Wasser, 0,33 ml 30% (w/v) Acrylamid, 0,25 ml 1 M Tris-HCl, 0,02 ml 10% (w/v) SDS, 0,02 ml 10% (w/v) APS, 0,002 ml TEMED, pH 6,8			
Trenngel (10 ml)			
Komponenten	10% [ml]	12% [ml]	15% [ml]
Wasser	4	3,3	2,3
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5		
30% Acrylamid	3,3	4	5
10 % (w/v) SDS	0,1		
TEMED	0,1		
10% (w/v) APS	0,004		

2.15.4 Western-Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer „Semi-Dry"-Transferapparatur (BioTech Fischer, Reiskirchen) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (50 mM Tris, 40 mM Glyzin, 20% (v/v) Ethanol) bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² für 2h.

2.15.5 Proteinfärbetechniken

2.15.5.1 Alternative Coomassiefärbung (Fairbanks *et al*., 1971)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel in 100 ml Lösung A (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,05% (w/v) Coomassie Blau R-250) in der Mikrowelle (1000 W, ~2 min) zum Kochen gebracht. Über 5 min wurde das Gel unter Schütteln auf RT abgekühlt, in Wasser gewaschen, in 100 ml Lösung B (10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,005% (w/v) Coomassie Blau R-250) erneut aufgekocht, anschließend mit Wasser gewaschen und in Lösung C (10% (v/v) Eisessig, 0,002% (w/v) Coomassie Blau R-250) aufgekocht, bevor es nach Waschen mit Wasser, mit 100 ml Lösung D (10% (v/v) Eisessig) und einem Zellstofftuch in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend unter Schütteln entfärbt wurde.

2.15.5.2 Ponceau-S-Färbung (Steffen und Linck, 1989)

Die Effizienz des Transfers sowie die Beladung wurden mittels Ponceau-S-Färbung überprüft. Der Western-Blot wurde für 1 min in Färbelösung (0,05% (w/v) Ponceau-S, 0,5% (w/v) TCA) geschwenkt, mit Wasser entfärbt und dokumentiert.

2.15.6 Immunodetektion von Proteinen

Für die Immunodetektion wurden die Membranen kurz in 1x TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween® 20, pH 7,5) gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C in 1x TBST, 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Der Western-Blot wurde anschließend mit polyklonalem Antikörper in Blockierlösung (0,1x TBST, 5% (w/v) Magermilchpulver) für 1 h bei RT inkubiert und dreimal für 20 min mit 0,1x TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären „Goat Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate" (Bio-Rad, USA) Antikörper erfolgte in Blockierlösung (Tab. 2-5.) für 1 h bei RT. Anschließend wurde der Blot dreimal für 20 min mit 0,1x TBST gewaschen und für 5 min in 1x TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) geschwenkt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des „ECL+Plus Reagenz" (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben.

Tab. 2-5.: Antikörperbedingungen

Primärer Ak	Bed. prim. Ak	Waschbed.	Bed. sek. Ak
Phospho-p44/42 MAP Kinase Antibody (Cell Signaling, USA)	0,1x TBS, 0,1% (v/v) Tween® 20	0,1x TBS, 0,1% (v/v) Tween® 20	0,1x TBS, 0,1% (v/v) Tween® 20

2.16 *in-Gel*-MBP-Kinasenachweis (Usami *et al*., 1995)

Proteinextrakte (20-40 µg Protein) wurden auf einer 10%-igen mit 0,3 mg/ml MBP (Sigma, Steinheim) koploymerisierten SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.13.3). Das SDS wurde durch viermaliges Waschen in Puffer I (50 mM Tris-HCl, 20% (v/v) Isopropanol, pH 8,0) für 20 min entfernt und das Gel anschließend zweimal für 10 min in Puffer II (50 mM Tris-HCl, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0) äquilibriert. Die Renaturierung der Proteine erfolgte für 16 h bei 4°C in Puffer III (50 mM Tris-HCl, 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,04% (v/v) Tween® 40, pH 8,0). Nach 10 min Äquilibrierung in Kinasepuffer (40 mM HEPES, 15 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0,1 mM EGTA, pH 7,5) erfolgte für 30 min bei 37°C die *In-Gel*-Kinasereaktion in Kinasepuffer unter Zusatz von 1 µCi/ml γ-[^{32}P]-ATP. Die Reaktion wurde durch fünfmaliges waschen in Stoppuffer (5% (w/v) TCA, 1% (v/v) Phosphorsäure) für 30 min beendet und gleichzeitig nicht-inkorporierte Radioaktivität entfernt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiografisch analysiert.

2.17 Immunopräzipitation und Kinasenachweis (Ichimura *et al*., 2000)

Gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 Vol. Kinaseextraktionspuffer (Kap. 2.13.1) homogenisiert und zentrifugiert (10 min, 4°C, 12.000 x *g*). Danach wurde 1/10 Vol. 50%-iger (v/v) ProteinA-Sepahrose CL4B-Suspension (Amersham Biosciences, Freiburg) zugegeben, die zuvor mit Puffer A (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM NaF, 0,1 % (v/v) Tween® 20, pH 7,4) äquilibriert wurde. Nach Zentrifugation (2 min, 4°C, 800 x *g*) wurde der Überstand unter Rotieren für 16 h bei 4°C mit einer 1:100 Verdünnung des entsprechenden Antikörpers inkubiert. Anschließend wurden 20 µl 50%-ige (v/v), mit Puffer A äquilibrierter ProteinA-Sepahrose CL4B-Suspension (Amersham Biosciences, Freiburg) zugegeben und für 2 h bei 4°C geschwenkt. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet dreimal 1 ml Puffer B (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton-X-100, pH 7,5), einmal mit Puffer C (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton-X-100, pH 7,5) und einmal mit 1 ml Puffer D (20 mM Tris-HCl, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 1mM DTT, pH 7,5) gewaschen.

Das Pellet wurde in 40 µl Kinasepuffer A (20 mM HEPES, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mg/ml MBP, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotenin, 50 µCi/ml γ-[^{32}P]-ATP) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2x Probenpuffer (200 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Glyzerin, 4% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) wurde die Reaktion durch Erhitzen für 5 min auf 95°C abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einer 15%-igen SDS-PAGE (Kap. 2.13.3) aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und autoradiografisch analysiert.

2.19 Chlorophyllgehaltbestimmung

Für die Extraktion der Pigmente aus gemörsertem Pflanzenmaterial wurden 1,6 ml eines 80%-igen (v/v) Aceton-Wasser-Gemisches verwendet. Das Chlorophyll wurde durch starkes Schütteln extrahiert (bis alles Material farblos war, mindestens 1 h) und der Extrakt bei λ = 663 nm und λ = 646 nm spektrophotometrisch gemessen. Zur Bestimmung des Pigmentgehaltes dienten folgende Formeln (Lichtenthaler und Wellburn, 1983):

Chlorophyll a (µg/ml Extrakt) = $12{,}21 * OD_{663} - 2{,}81 * OD_{646}$
Chlorophyll b (µg/ml Extrakt) = $20{,}13 * OD_{646} - 5{,}03 * OD_{663}$

Pigmentgehalt (mg/g) = Aceton (ml) * Pigmentgehalt (µg/ml Extrakt) / Einwaage (mg)

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von schwermetallresponsiven Genen in *A. halleri*

Anliegen dieser Arbeit war es differenziell exprimierter Gene im Metallophyten *Arabidopsis halleri* zu identifizieren und anschließend deren Beteiligung an der Schwermetalltoleranz bzw. der Schwermetallhomöostase zu untersuchen. Dabei diente die transkriptionelle Responsivität einzelner Gene anfänglich als Hinweis auf deren funktionelle Rolle. Die in *A. halleri* gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend vergleichend in *A. thaliana*, dem pflanzlichen Modellsystem, bearbeitet.

Wie bereits beschrieben, zeichnet sich *A. halleri* im Gegensatz zu *A. thaliana* durch die Fähigkeiten aus, tolerant gegenüber hohen Zn^{2+}- und Cd^{2+}-Konzentrationen zu sein (Bert *et al*., 2000; 2003) und Zn^{2+} und Cd^{2+} zu hyperakkumulieren (Zhao *et al*., 2000; Dahmani-Müller *et al*., 2000; Bert *et al*., 2002). Die Wahl der eingesetzten Zn^{2+}-Konzentration für die *A. halleri*-Experimente zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene beruhte ursprünglich auf diesen Erkenntnissen. Zusätzlich wurden für die Auswahl der Cd^{2+}- und Cu^{2+}-Konzentrationen die Beobachtungen von Xiang und Oliver (1998) berücksichtigt, die den Einfluss von Schwermetallen auf die Glutathionbiosynthese untersuchten.

3.1.1 Transkriptionelle Aktivierung des Schwermetallmarkergens *GSH1* in *A. halleri*

Um einen molekularen Marker der Schwermetallresponsivität in *A. halleri* zu erhalten, wurde die γ-Glutamylcysteinsynthetase (*GSH1*) gewählt, für deren Transkript in *A. thaliana* bereits eine Induktion nach Cd^{2+}- und Cu^{2+}-Behandlung gezeigt werden konnte (Xiang und Oliver, 1998). Die γ-Glutamylcysteinsynthetase katalysiert die Kondensation von Glutamat und Cystein, dem ersten Schritt der Glutathionbiosynthese (Buchanan *et al*., 2000).

Zwei Wochen alte, in Flüssigkultur angezogene *A. halleri*-Keimlinge wurden mit einem Schwermetallgemisch, bestehend aus 100 µM Cd^{2+}, 500 µM Cu^{2+} und 500 µM Zn^{2+} für 0h (unbehandelte Kontrolle), 1 h, 4 h, 8 h und 24 h behandelt. Wie bereits erwähnt, basierten die im Schwermetallgemisch verwendeten Schwermetallkonzentrationen und das Medium auf den Erkenntnissen von Xiang und Oliver (1998) sowie von Bert *et al*. (2000).

Gesamt-RNA wurde zu den beschriebenen Zeitpunkten isoliert und für Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Bereits nach 4 h war eine deutliche Akkumulation des *GSH1*-Transkriptes zu beobachten. Nach 24 h wurde der Maximalwert erreicht. (Abb. 3-1).

Damit konnte gezeigt werden, dass die *GSH1* als Markergen geeignet ist und die eingesetzten Schwermetallkonzentrationen zur Identifizierung schwermetallresponsiver Gene in *A. halleri* genutzt werden können.

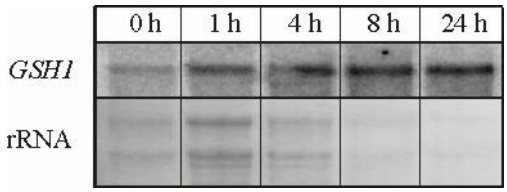


Abb. 3-1: Northern-Blot-Analyse schwermetallbehandelter *A. halleri*-Keimlinge
20 µg Gesamt-RNA wurde aus *A. halleri*-Keimlingen, die für 1 h, 4 h, 8h und 24 h mit 100 µM Cd^{2+}, 500 µM Zn^{2+} und 500 µM Cu^{2+} behandelt wurden isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. Als heterologe Sonde zur radioaktiven Hybridisierung diente das 1,1 kb lange EST G6D12T7 von *AtGSH1* (At4g23100). Als Ladungskontrolle diente das EtBr-gefärbte Agarosegel.

3.1.2 Identifizierung schwermetallregulierter Gene in *A. halleri*

3.1.2.1 RFDD-Analyse

Die Identifizierung schwermetallregulierter Transkripte sollte zunächst mittels einer „Restriction Fragment Differential Display"-Analyse (RFDD; Habu *et al*., 1997) erfolgen. Diese Methode ist eine Weiterentwicklung der „cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism"-Analyse (cDNA-AFLP; Vos *et al*., 1995; Bachem *et al*., 1996). Für die RFDD-Analyse wurde der kommerziell erhältliche „displayPROFILE™ Kit" der Firma Display Systems Biotech (Dänemark) verwendet. Die aus Gesamt-RNA hergestellte doppelsträngige cDNA wurde mittels der Restriktionsendonuklease *Taq*I gespalten und an die entstandenen Überhänge ein Adaptergemisch ligiert. Das Adaptergemisch bestand zu gleichen Teilen aus zwei Adaptern. Die Sequenz des einen Adapters ermöglichte eine Bindung an die 3'-Überhänge der cDNA-Fragmente. Der zweite Adapter besaß ein 5'-überhängendes Ende und am 3'-Ende eine Aminogruppe, die das Auffüllen des Überhangs verhindern sollte. An diese Adapter konnten in einer anschließenden PCR-Reaktion zwei unterschiedliche Primer binden, die jeweils spezifisch für einen Adapter waren. Zusätzlich sollte ein Primer selektiv die ersten drei Basen des cDNA-Fragments erkennen. Diese Kombination sollte die Amplifizierung von Fragmenten, an die zwei identische Adapter ligiert wurden, verhindern. Aufgrund der drei selektiven Basen konnten mit 4^3 Primerkombinationen 64 cDNA-Teilpopulationen amplifiziert werden (Sequenzen der Primer siehe Anhang B).
Die RFDD-Analyse schwermetallbehandelter *A. halleri*-Keimlinge ergab für 64 getestete Primerkombinationen ein übersichtliches Bandenmuster von durchschnittlich 11,4 Fragmenten pro Primerkombination. Mit 13 Primerkombinationen wurden keine Fragmente gefunden. Insgesamt konnten 728 Fragmente ermittelt werden. Davon besaßen 34 Fragmente ein differenzielles Amplifikationsmuster (Tab.3-1). Für die Auswertung wurden neben induzierten und reprimierten Fragmenten, auch Fragmente mit einem transienten Expressionsmuster berücksichtigt.

Tab. 3-1: Zusammenfassung des RFDD-Experiments

	Anzahl	%
Mögliche Primerkombinationen	64	100
Getestete Primerkombinationen	64	100
Funktionierende Primerkombinationen	51	79,7
Primerkombinationen mit differenziell amplifizierten Fragmenten	19	29,7
Summe der dargestellten Fragmente	728	100
Anzahl der Fragmente pro Primerkombination	11,4	
Differenziell amplifizierte Fragmente	34	4,7
Induzierte Fragmente	16	2,2
Reprimierte Fragmente	8	1,1
Fragmente mit transientem Expressionsmuster	10	1,4
Eluierte, klonierte und sequenzierte Fragmente	32	100
Keine Sequenzdaten	4	12,5
Sequenzen aller Klone eines Fragments identisch	20	62,5
Zwei verschiedene Sequenzen pro Fragment	5	15,6
Drei verschiedene Sequenzen pro Fragment	3	9,4
Erhaltene Sequenzen	39	100
Homologie der Sequenzen zu:		
ribosomaler RNA	35	89,8
Glutathion-S-Transferasen	2	5,1
unbekannten Proteinen	2	5,1

Die differenziell exprimierten Fragmente wurden aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten, eluiert und anschließend mittels PCR amplifiziert, kloniert und jeweils vier Klone sequenziert.
Dabei konnte nur für vier Klone (4-1, 11-1, 13-1 und 27-1) eine Homologie zu *A. thaliana*-Genen gezeigt werden (Tab. 3-2).
Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Klon 4-1 zeigte Homologie zu einem Protein unbekannter Funktion, Klon 11-1 zu *AtGSTF2*, einer Glutathion-S Transferase, die als Auxin bindendes Protein charakterisiert wurde (Zettl *et al*., 1994) und durch eine Reihe von biotischen und abiotischen Stressfaktoren induziert wird (Wagner *et al*., 2002). Auch die abgeleitete Sequenz von Klon 13-1 besaß Homologie zu einer Glutathion S-Transferase *AtGSTU24*, die noch nicht näher charakterisiert ist (Wagner *et al*., 2002). Klon 27-1 besaß Homologie zu einer Vorstufe eines Hevein-ähnlichen pflanzlichen Abwehrproteins (Garcia-Olmedo *et al*., 1998). Annähernd 90% der Sequenzen waren homolog zu ribosomaler RNA (Tab.3-1).
Neben dem hohen Anteil an ribosomaler Kontamination war auch die erhaltene geringe Bandenanzahl ein weiterer Grund, für weiterführende Untersuchungen die ursprüngliche cDNA-AFLP-Methode nach Bachem *et al*. (1996) zu benutzen.

Tab. 3-2: Ergebnisse des RFDD-Experiments

Fragment-Nr.	Fragment-länge	RFDD-Pattern	AGI-Kode	Protein/Funktion
4-1	120 bp	Transient bei 2 h	At2g16590	Unbekanntes Protein
11-1	125 bp	Induziert nach 2 h	At4g02520	AtGSTF2 (Atpm24.1)
13-1	72 bp	Induziert nach 8 h	At1g17170	AtGSTU24
27-1	81 bp	Transient bei 2 h	At3g04720	Vorstufe von Heveinr

3.1.2.2 cDNA-AFLP-Analyse

Die cDNA-AFLP-Analyse zur Isolation unbekannter, durch Schwermetallbehandlung induzierter Transkripte, wurde nach einer modifizierten Methode von Vos *et al*. (1995) und Bachem *et al*. (1996) durchgeführt (Kap 2.6). PolyA$^+$-RNA wurde aus kontroll- und schwermetallbehandelten *A. halleri*-Keimlingen isoliert und in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mittels der Restriktionsendonukleasen *Taq*I und *Apo*I gespalten.

Die Restriktionsendonuklease *Taq*I mit einer Erkennungssequenz von vier Nukleotiden wurde verwendet, um möglichst kurze und damit leicht zu analysierende Fragmente doppelsträngiger cDNA zu erhalten. Zur Reduzierung der Komplexität des Bandenmusters diente die Verwendung der Restriktionsendonuklease *Apo*I, die über eine Erkennungssequenz von sechs Nukleotiden verfügt.

An die entstandenen Fragmente wurde ein Gemisch, bestehend aus zwei Adaptern spezifisch für die beiden eingesetzten Restriktionsendonukleasen, ligiert. In einer anschließenden PCR konnten nur Fragmente vervielfältigt werden, die aus einer Restriktion mit beiden Endonukleasen hervorgegangen waren (Vos *et al*., 1995).

Zur Minimierung des Hintergrundes erfolgte die Amplifikation der Fragmente in zwei Schritten (Vos *et al*., 1995). In der Voramplifikation wurden alle generierten cDNA-Fragmente unter Verwendung von Primern, die spezifisch für den Adapter und die Restriktionsstelle waren, amplifiziert. Anschließend wurden die erhaltenen Fragmente in einer weiteren PCR mit selektiven Primern amplifiziert. Dabei führten zwei selektive Nukleotide am 3‘-Ende der Primer nur zur Amplifikation von Fragmenten, deren erste zwei Basen nach der Restriktionsstelle mit den selektiven Nukleotiden der Primer hybridisierten. (Sequenzen der Primer siehe Anhang C).

Die Verwendung von jeweils zwei selektiven Basen pro Primer ermöglichte eine Amplifikation von insgesamt 256 (4^4) cDNA-Teilpopulationen.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen, wurden für jeden Zeitpunkt drei unabhängige Proben mittels cDNA-AFLP analysiert. Nach erfolgreicher Voramplifikation wurden Aliquots der unabhängigen Proben gemischt. Das Gemisch und die einzelnen Proben wurden anschließend selektiv amplifiziert. Die Bandenmuster waren sowohl für die unabhängigen Experimente als auch das Gemisch reproduzierbar. Allerdings konnten zwischen den einzelnen Experimenten Intensitätsunterschiede im Bandenmuster nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung eines Gemisches bestehend aus Aliquots der drei unabhängigen

Experimente konnten diese Intensitätsunterschiede angeglichen werden (Daten nicht gezeigt). Alle weiteren cDNA-AFLP-Analysen erfolgten mit dem Gemisch der drei unabhängigen Experimente.
Ein repräsentativer Ausschnitt aus einem cDNA-AFLP-Gel ist in Abb. 3-2 dargestellt, in dem induzierte und reprimierte Fragmente sowie Fragmente mit transientem Expressionsmuster durch entsprechende Pfeile markiert wurden.

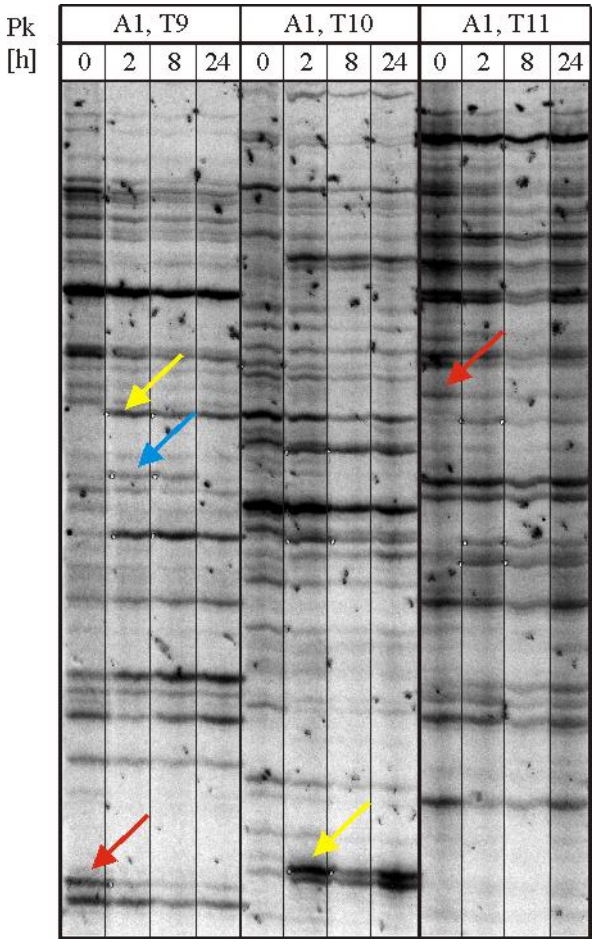


Abb. 3-2: cDNA-AFLP-Gelbild schwermetallbehandelter *A. halleri*-Keimlinge
Dargestellt sind verschiedene selektive Primerkombinationen (Pk) der cDNA-AFLP-Analyse von *A. halleri*-Keimlingen zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 8 h und 24 h nach Behandlung mit einem Gemisch aus 100 µM Cd^{2+}, 500 µM Zn^{2+} und 500 µM Cu^{2+}. Gelbe Pfeile markieren induzierte Banden, roter Pfeile reprimierte Banden und blaue Pfeile transient exprimierte Banden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 80 der 256 möglichen Primerkombinationen ausgewertet. Für 64 Primerkombinationen konnte ein komplexes Bandenmuster, wie in Abb. 3-2 dargestellt, erhalten werden. Für 16 Primerkombinationen konnte kein Bandenmuster dargestellt werden. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen liegt darin, dass unter den gewählten PCR-Bedingungen einzelne Primer nicht an die cDNA-Fragmente binden konnten, oder keine Fragmente für eine Bindung vorhanden waren. Durchschnittlich wurden 32,6 Banden in einem Größenbereich von 20 bp bis 350 bp pro Primerkombination gefunden. Das entspricht insgesamt 2610 Fragmenten. Davon zeigten

278 Fragmente ein differenzielles Expressionsmuster. 202 waren induziert und 52 reprimiert und 24 Fragmente zeigten über den Versuchszeitraum ein transientes Expressionsmuster.
Insgesamt wurden 216 differenziell exprimierte Fragmente aus den Gelen eluiert. Davon konnten durch PCR 175 mit nichtselektiven Primern (Apo+0 und Taq+0, Sequenzen der Primer siehe Anhang C) amplifiziert werden. Um die mit der Direktsequenzierung von PCR-Produkten verbundenen Probleme zu umgehen (Ditt *et al.*, 2001; Durrant *et al.*, 2000), wurden die reamplifizierten Fragmente in den pGEM®-T-Vektor ligiert und damit *E. coli*-Zellen transformiert. Von den insgesamt 175 Fragmenten konnten für 147 Fragmente entsprechende Klone erhalten und jeweils vier unabhängige Klone sequenziert werden.
Insgesamt konnten 21 identifizierten Genen mehrere Klone, die von verschiedenen Fragmenten stammten, zugeordnet werden. Das Vorhandensein mehrerer Fragmente pro Gen kann verschiedene Ursachen haben. Durch die Verwendung der zwei Restriktionsendonukleasen (*Apo*I und *Taq*I) entstanden für jedes Gen mindestens zwei Fragmente, die später mit unterschiedlichen selektiven Primern amplifiziert wurden. Dies konnte für die Klone 44,3 und 52,3, die Klone 71,1 und 75,1, die Klone 105,3 und 118,1 sowie die Klone 135,2 und 138,3 gezeigt werden. Daneben kann es bei Fragmenten von hoch abundanten Transkripten während der selektiven Amplifikation zu einer unspezifischen Bindung der Primer kommen. Damit erhält man identische Fragmente durch unterschiedliche Primerkombinationen (Bachem *et al.*, 1996). Dies konnte für die Klone 46,2 und 52,4, 124,1 und 129,1 sowie die Klone 18,1, 32,4, 47,2 und 52,1 gezeigt werden.
Nach Abzug aller „leeren“ Vektor- und Mehrfachsequenzen pro Klon wurden 191 unterschiedliche Sequenzen analysiert, die 111 Fragmenten zugeordnet werden konnten. Pro eluiertem und kloniertem Fragment wurden im Durchschnitt 1,7 Sequenzen ermittelt. Zur Erhöhung der Anzahl identischer Klone pro Fragment wurde die Reamplifikation durch die Verwendung selektiver Primer und stringenterer PCR-Bedingungen optimiert (Daten nicht gezeigt).
Eine genaue Auflistung aller Fragmente, den dazugehörigen, mittels BLAST-Datenbankanalyse (Altschul *et al.*, 1990; 1997) ermittelten homologen Genen, sowie der möglichen abgeleiteten Funktion sind in der Tabelle Anhang D dargestellt. Auf die Auflistung sogenannter „Scores“ bzw. e-Werte wurde verzichtet, da diese statistischen Werkzeuge die Länge der Fragmente nicht berücksichtigten. So besitzen beispielsweise hoch homologe, aber kurze Fragmente (25-40 bp) einen niedrigeren „Score“ als weniger homologe, lange Fragmente (> 100 bp). Die Zuordnung der homologen Gene erfolgte daher nach dem ersten Treffer in der BLAST-Analyse.
Anhand der erhaltenen Sequenzen war es möglich, Aussagen über den Verwandtschaftsgrad zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* zu machen. So konnte eine Sequenzidentität von 94,2 % auf Nukleinsäureebene im kodierenden Bereich der Gene zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* ermittelt werden.
Für 97,4 % (186) der *A. halleri* Klone konnte eine eindeutig homologe Sequenz in *A. thaliana* gefunden werden. Die restlichen 2,6 % (5) der Klone zeigte keine Homologie zu pflanzlichen Sequenzen und sind auf Verunreinigungen während einzelner Syntheseschritte zurückzuführen (Tab. 3-3).

Tab. 3-3:Zusammenfassung der cDNA-AFLP-Analyse

	Anzahl	%	%
Mögliche Primerkombinationen	256	100	
Getestete Primerkombinationen	80	31	
Funktionierende Primerkombinationen	64	25	
Primerkombinationen mit differenziell amplifizierten Banden	54	21	
Summe der dargestellten Banden	2610	100	
Durchschnitt Bandenanzahl pro Primerkombination	32,6		
Differenziell amplifizierte Banden	278	10,7	100
Induzierte Banden	202	8	73
Reprimierte Banden	52	2	19
Banden mit transientem Expressionsmuster	24	1	8
Ausgeschnittene Fragmente	216	100	
Reamplifizierte Fragmente	175	83	
Klonierte und sequenzierte Fragmente (4 Klone / Fragment)	147	70	
Erhaltene Sequenzen	191	100	
Homologie der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu:			
keinen bekannten Proteinen	39	20,4	
Proteinen des Primärmetabolismus und der Photosynthese	39	20,4	
stressresponsiven Proteinen	36	18,8	
Proteinen der Signaltransduktion	18	9,4	
Proteinen der RNA Synthese	15	7,9	
Proteinen der Transkriptionskontrolle	11	5,8	
Transportproteinen	8	4,2	
Proteinen des Schwefel- und Glutathionmetabolismus	5	2,6	
Proteinen der Proteindegradation	5	2,6	
Proteinen der DNA-Rekombination und -Reparatur	3	1,6	
nicht kodierenden *A. thaliana* Sequenzen	7	3,7	
keinen bekannten Sequenzen	5	2,6	

Die abgeleiteten Aminosäuressequenzen der 186 zu den cDNA-AFLP-Klonen korrespondierenden kodierenden Sequenzen aus *A. thaliana* zeigten Homologien zu Proteinen unterschiedlichster Klassen. Ein Fünftel (20,4 %) besaß Homologie zu Proteinen unbekannter Funktion bzw. Proteinen des Primärstoffwechsels und der Photosynthese. 18,8 % waren homolog zu stressresponsiven Proteinen. 9,4 % zeigten Homologien zu Proteinen, die an der Signaltransduktion und- perzeption beteiligt sind. Darunter konnten für fünf abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu putativen Rezeptorkinasen ermittelt werden. Für 7,9 % wurden Homologien zu Proteinen der RNA-Synthese ermittelt, 5,8 % zu Transkriptionsfaktoren, 4,2 % zu Transportproteinen, jeweils 2,6 % zu Proteinen, die am Proteinabbau bzw. am Schwefel- und Glutathionmetabolismus beteiligt sind. 1,6 % der abgeleiteten Sequenzen besaßen Homologien zu Proteinen der DNA-Rekombination und -Reparatur. (Tab. 3-3).

3.1.3 Auswahl und Charakterisierung der Kandidatengene

3.1.3.1 Auswahl der Kandidatengene anhand von Sequenzhomologien zu Genen bekannter Funktion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten ursprünglich Gene identifiziert werden, die an der Ausbildung der Schwermetalltoleranz in *A. halleri* beteiligt sind. Für diese Gene wurde angenommen, dass sie nur in *A. halleri* vorkommen und durch Schwermetalle transkriptionell aktiviert werden. Mit der durchgeführten cDNA-AFLP-Analysen gelang es nicht, solche Gene zu identifizieren.

Ein Hauptgrund dafür ist, das die meisten Merkmale, die an der Ausprägung von Schwermetalltoleranzmechanismen in Pflanzen beteiligt sind, konstitutiv ausgeprägt sind. Dies konnte durch genetische Kreuzungsstudien zwischen *A. halleri* und *A. lyrata*, die nicht tolerant und hyperakkumulierend ist, für die Merkmale der Zn^{2+}- und Cd^{2+}-Hypertoleranz sowie der Hyperakkumulation gezeigt werden (Macnair *et al*., 1999; Bert *et al*., 2002 ;2003). Zusätzlich belegte dies der Vergleich verschiedener *A. halleri*-Populationen, die selbst auf metallarmen Böden in der Lage waren Zn weiterhin zu hyperakkumulieren (Macnair, 2002; Bert *et al*., 2002). Allerdings waren alle bisherigen Untersuchungen nicht in der Lage, einzelne Gene die für die Ausprägung dieser Merkmale verantwortlich sind, zu identifizieren. Mit Hilfe von Affymetrix-Mikroarrays konnte in vergleichenden Untersuchungen zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* gezeigt werden, dass in *A. halleri* eine Reihe von Genen, die für mögliche Toleranzfaktoren kodieren, konstitutiv höher exprimiert sind (Weber *et al*., in Druck).

Ein weiteres Ziel der cDNA-AFLP-Analyse war es, Gene zu identifizieren, die anhand ihrer Sequenzhomologie für Proteine kodieren, die an der Schwermetallhomöostase beteiligt sind, wie Transportproteine, Chelatoren, Enzyme für die Synthese von Chelatoren sowie putative Signaltransduktionskomponenten.

Insgesamt wurden sieben Klone zur weiteren Analyse ausgewählt. Davon besaßen vier Klone Homologie zu Genen, die für putative Signaltransduktionskomponenten und drei Klone Homologie zu Genen, die für Transportproteine kodieren. Um die Eindeutigkeit der erhaltenen homologen Gene aus *A. thaliana* zu belegen, wurden für die sieben ausgewählten Klone exemplarisch die ersten zwei Ergebnisse der BLAST-Datenbankanalyse sowie die dazugehörigen e-Werte aufgelistet (Tab. 3-4).

Mit Hilfe von RT-PCR-Analyse sollten die im cDNA-AFLP erhaltenen differenziellen Expressionsmuster verifiziert werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus flotierten *A. halleri*-Blättern isoliert, die wie in Kap. 3.1.1 beschrieben behandelt wurden. Die verwendeten Primer wurden vom jeweils homologen *A. thaliana*-Gen abgeleitet. Anhand nachfolgender Sequenzierung und Analyse der Sequenzdaten konnte die Homologie zum jeweiligen *A. thaliana*-Gen bestätigt werden. Für vier der sieben Kandidatengene wurde das im cDNA-AFLP erhaltene Expressionsmuster bestätigt (Tab. 3-4).

Eine genauere Charakterisierung für die ausgewählten sieben Kandidatengene ist nachfolgend beschrieben:

(1) Der Klon 7,1 besaß eine Länge von 25 bp und zeigte signifikante Homologie zum 3'-untranslatierten Bereich einer putativen Proteinphosphatase 2C (PP2C) aus *A. thaliana* (At2g30020). Proteinphosphatasen 2C wurden bereits als Komponenten von Signaltransduktionskaskaden beschrieben (Kerk *et al*., 2002; Leung *et al*., 1997). Die Analyse der Expression erfolgte auf den kodierenden Bereich der *PP2C* durch RT-PCR und bestätigte das im cDNA-AFLP erhaltene Expressionsmuster (Tab. 3-4).
(2) Der Klon 10,1 umfasste 148 bp. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels BLAST-Datenbanksuche des noch unvollständig annotierten *Arabidopsis*-Genoms und ergab eine Homologie zur Sequenz der mitogenaktivierten Proteinkinase 4 (AtMPK4; At4g01370) aus *A. thaliana*. Um zusätzliche Sequenzinformation für das zu *AtMPK4* homologe *A. halleri*-Gen zu erhalten, wurden 5'- und 3'-RACE-Experimente (Kap. 2.11) durchgeführt. Die so erhaltene 636 bp lange unvollständige Sequenz zeigte wie erwartet die höchste Homologie zu *AtMPK4*. Durch Petersen *et al*. (2000) wurde AtMPK4 als ein negativer Regulator der systemisch erworbenen Resistenz in *A. thaliana* beschrieben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass AtMPK4 durch eine Reihe biotischer und abiotischer Stressfaktoren reguliert wird (Ichimura *et al*., 2000). Die Analyse des Klones 10,1 durch RT-PCR bestätigte das im cDNA-AFLP erhaltene Expressionsmuster (Tab. 3-4).
Nach der Veröffentlichung des vollständig sequenzierten Genoms *von A. thaliana* (The *Arabidopsis* Initiative, 2000) und der inzwischen annähernd kompletten Annotierung aller Gene (Wortman *et al*., 2003), wurde der Klon erneut auf seine Sequenzhomologie zu bekannten Genen hin überprüft. Dabei wurde deutlich, dass sowohl der Klon 10,1 als auch das RACE-Fragment eine wesentlich höhere Homologie zu *AtMPK11* (At1g01560) besaßen. Beide MAP-Kinasen (MAPK) besitzen auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene eine Sequenzidentität von 86,6 % bzw. 89,2 %. Phylogenetisch können die beiden MAP-Kinasen einer Untergruppe der *A. thaliana* MAP-Kinasen zugeordnet werden (Ichimura *et al*., 2002).
Die Analyse der verwendeten Primer ergab, dass beide Primer an die Sequenz von *AtMPK4* und an die Sequenz von *AtMPK11* binden können. Unter Verwendung von für *AtMPK4* und *AtMPK11* spezifischen Primern konnte in weiteren RT-PCR-Analysen gezeigt werden, dass nur *AtMPK11* differenziell unter den genannten Bedingungen exprimiert wurde. Hingegen konnte für *AtMPK4* weder eine Induktion noch eine Repression nach Schwermetallbehandlung gefunden werden.
(3) Der Klon 11,2 hatte eine Länge von 75 bp. Die Sequenzanalyse des Fragmentes 11,2 zeigte hohe Homologie zu dem basischen Leucin-Zipper (bZIP)-Transkriptionsfaktor *AtbZIP6*. AtbZIP6 (At2g22850) gehört in die Unterklasse S der bZIP-Proteine, für die eine Beteiligung an der Regulation von Stressantworten diskutiert wird (Jakoby *et al*., 2002). In der Hefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass bZIP-Transkriptionsfaktoren wichtig für die Toleranz gegenüber Schwermetallen sind (Wu *et al*., 1993). RT-PCR-Analysen des Klones 11,2 ergaben eine Induktion nach Schwermetallbehandlung vergleichbar mit dem im cDNA-AFLP erhaltenen Expressionsmuster.
(4) Der cDNA-AFLP-Klon 43,2 hatte eine Länge von 51 bp und besaß Homologie zu einer putativen Rezeptorkinase (*AtKIN7*; At5g58150). Rezeptorkinasen sind integrale Membranproteine und zeichnen sich durch eine extrazelluläre Rezeptordomäne und eine zytoplasmatische

Kinasedomäne aus. Die Aktivierung der Kinase erfolgt durch die Bindung eines Liganden an die Rezeptordomäne und ist damit Ausgangspunkt von Signaltransduktionskaskaden (Becraft, 2002). Im Gegensatz zu dem im cDNA-AFLP erhaltenen Expressionsmuster zeigte die entsprechende RT-PCR-Analyse eine Repression für das Homolog von *AtKIN7* (Tab. 3-4). Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf das versehentliche Vertauschen von Fragmenten zurückzuführen. Daher wurde von einer weiteren Analyse des Klons abgesehen.

(5) Der Klon 78,1 zeichnete sich durch eine Länge von 28 bp aus. Für diesen Klon konnte eine Sequenzhomologie zu einem Sulfattransporter aus *A. thaliana* (At1g80310) ermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Sulfat in die Wurzeln durch Glutathion beeinflusst wird (Vidmar *et al*., 2000). Mit Hilfe der anschließenden RT-PCR-Analyse konnte die im cDNA-AFLP erhaltene Repression des Fragmentes 78,1 bestätigt werden (Tab. 3-4). Allerdings war die Expression des putativen Sulfattransporters sehr schwach, so dass der Klon nicht weiter charakterisiert wurde.

(6) Der Klon 79,1 hatte eine Länge von 95 bp. Die Sequenzanalyse des Klons zeigte hohe Homologie zu einem nukleotidbindenden Protein aus *A. thaliana* (At5g50960). Nukleotidbindende Proteine sind u. a. an der Detoxifizierung von Schwermetallen durch ABC-Transporter beteiligt (Kerr, 2002; Martinoia *et al*., 2002). RT-PCR-Analysen des Klones 79,1 konnten das im cDNA-AFLP erhaltenen Expressionsmuster nicht bestätigen. Somit erfolgte keine weitere Analyse des Klons 79,1 (Tab. 3-4).

(7) Der Klon 101,2 hatte eine Länge von 81 bp. Die Sequenzanalyse des Klons 101,2 zeigte hohe Homologie zu einer H^+-ATPase aus *A. thaliana* (At4g11150). In *E. coli* wurde beispielsweise gezeigt, dass die ATPase ZntA an der Detoxifizierung von Schwermetallen beteiligt ist (Sharma *et al*., 2000). RT-PCR-Analysen des Klones 101,2 konnten das im cDNA-AFLP erhaltenen Expressionsmuster nicht bestätigen. Mit dem Klon 101,2 erfolgten keine weiteren Analysen (Tab. 3-4).

Für weiterführende Untersuchungen wurden die Klone 7,1, 10,1 und 11,2 ausgewählt. Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurde die Gene hinsichtlich ihrer Antwort auf die einzelnen Schwermetalle sowie auf weitere Stressfaktoren (H_2O_2, NaCl, Sorbitol, SA und MeJA) charakterisiert. Diese Analysen sollten die Beteiligung dieser Gene und damit ihrer Genprodukte an einer allgemeinen Stressantwort ausschließen. Außerdem wurde die gewebespezifische Schwermetallexpression der Kandidatengene analysiert.

Tab. 3-4: RT-PCR-Analyse von cDNA-AFLP-Klonen

Neben der Bezeichnung des cDNA-AFLP-Klons und dessen Länge, sind auch die ersten zwei Treffer der BLAST-Datenbankanalyse (Altschul *et al.*, 1997) mit dem dazugehörigen e-Wert aufgelistet. Desweiteren sind die AGI-Kodes der Gene sowie deren mögliche Funktion beschrieben. Pfeile nach oben kennzeichnen eine Induktion, Pfeile nach unten eine Repression. Die Kombination von Pfeilen nach rechts und nach links kennzeichnen keine Veränderung in der Expression.

cDNA-AFLP-Klon	Fragment-länge	Ersten zwei Treffer der BLAST-Analyse	e-Wert	AGI Kode des ersten Treffers	Mögliche Funktion	Expression AFLP	Expression RT-PCR
7,1	25 bp	1. At2g30020 2. Homo sapiens BAC-Klon	8e-04 0,90	At2g30020	Protein Phosphatase 2C	↑	↑
10,1	148 bp	1. AtMPK11 2. AtMPK4	5e-24 4e-12	At1g01560	MAP Kinase (*AtMPK11*)	↑	↑
11,2	75 bp	1. AtbZIP6 2. Listeria monocytogenes strain	3e-17 1,6	At2g22850	bZip Transkriptions Faktor (*AtbZIP6*)	↑	↑
43,2	51 bp	1. AtKIN7 2. Homo sapiens BAC-Klon	9e-19 0,046	At5g58150	Rezeptor Kinase (*AtKIN7*)	↑	↓
78,1	28 bp	1. At5g50960 2. Homo sapiens BAC-Klon	1e-6 1,2	At1g80310	Sulfat Transporter	↓	↓
79,1	95 bp	1. At5g50960 2. Homo sapiens BAC-Klon	1e-6 1,2	At5g50960	Nukleotid-bindendes Protein	↑t	←→
101,2	81 bp	1. *A. thaliana* V-H^+ATPASE 2. Citrus V-H^+ATPASE	2e-32 5e-30	At4g11150	Protonen ATPase	↑	←→

3.1.3.2 Charakterisierung der Schwermetallantwort der Fragmente 10,1 und 11,2 mittels cDNA-AFLP in *A. halleri*

Um die Expression einzelner Fragmente hinsichtlich ihrer Schwermetallspezifität zu untersuchen, wurden zwei Wochen alte, in Flüssigkulturen angezogene *A. halleri*-Keimlinge für 0h (unbehandelte Kontrolle) und 8 h mit 50 und 250 µM Zn^{2+}, 10 und 50 µM Cd^{2+} sowie 50 µM Cu^{2+} behandelt und mittels cDNA-AFLP analysiert. Die Analysen ergaben für die Fragmente 10 und 11 eine selektive Induktion durch Cu^{2+}. Allerdings konnte in der unbehandelten Kontrolle im Falle von Fragment 10 ebenfalls eine Bande detektiert werden, die aber nicht von gleicher Intensität war (Abb. 3-3).

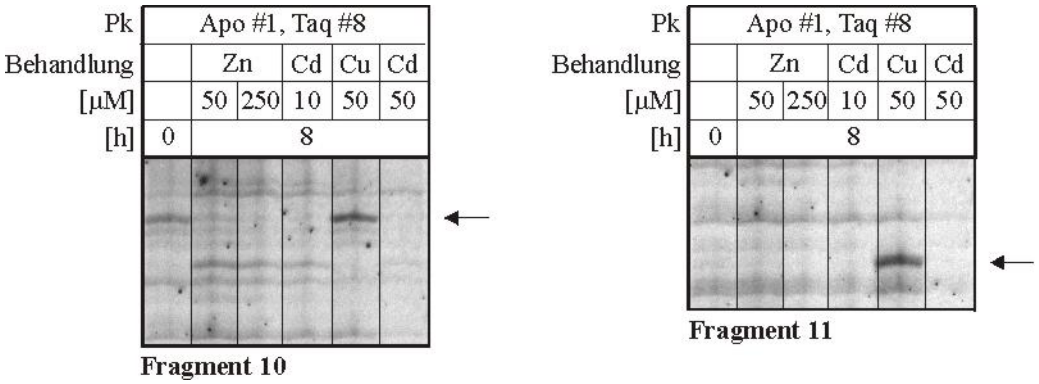


Abb. 3-3: Analyse Schwermetallspezifität der Fragmente 10 und 11 mittels cDNA-AFLP
Dargestellt ist das schwermetallspezifische Expressionsmuster der cDNA-AFLP-Fragmente 10 und 11, mit den dazugehörenden Primerkombinationen (Pk). Dazu wurden in Flüssigkultur angezogene *A. halleri*-Keimlinge mit verschiedenen Konzentrationen von Zn^{2+}, Cd^{2+} und Cu^{2+} für 8 h inkubiert und analysiert. Der Pfeil markiert die Position des jeweiligen Fragments.

3.1.3.3 Charakterisierung von *MPK11, bZip6* und der *PP2C* mittels RT-PCR

Neben dem bereits zu Beginn der Arbeiten eingesetzten Schwermetallgemisch wurden flotierte Blätter von *A. halleri* und *A. thaliana* für 2 h mit unterschiedlichen Zn^{2+}-, Cd^{2+}- und Cu^{2+}-Konzentrationen behandelt. In allen RT-PCR-Experimenten diente β-Tubulin (At5g44340) als Kontrolle der Effizienz der reversen Transkription. Um eine transkriptionelle Regulation durch oxidativen Stress ausschließen zu können, wurden flotierte Blätter außerdem mit H_2O_2 behandelt und die Transkriptakkumulation nach 2 h analysiert. Als Markergen für oxidativen Stress diente *AtGST6* (At2g47730; Chen *et al*., 1996).

Alle untersuchten Gene zeigten sowohl in *A. halleri* als auch in *A. thaliana* ein schwermetallspezifisches Expressionsmuster (Abb. 3-4 und Abb. 3-5).

Für *MPK11* konnte eine spezifische Induktion nach Cu^{2+}-Behandlung in *A. halleri* und in *A. thaliana* gezeigt werden. In *A. halleri* wurde die Induktion der Transkriptakkumulation nach Behandlung mit 250 µM Cu^{2+}, in *A. thaliana* dagegen schon ab einer Konzentration von 50 µM Cu^{2+} nachgewiesen. Im Gegensatz dazu akkumulierten die Transkripte der *MPK4* weder in *A. halleri* (Daten nicht gezeigt) noch in *A. thaliana.* Außerdem führte die Behandlung mit 100 µM Cd^{2+} nur in *A. thaliana* zur Transkriptakkumulation der *MPK11*.

Die Akkumulation des *bZIP6*-Transkriptes erfolgte *in A. thaliana* bereits nach Behandlung mit 10 µM Cd^{2+}. Im Gegensatz dazu waren für eine Induktion der Transkriptakkumulation des *bZIP6* in *A. halleri* 50µM bzw. 100 µM Cd^{2+} nötig. Außerdem konnte nach Behandlung mit 250 µM Cu^{2+} eine starke Transkriptakkumulation in beiden *Arabidopsis*-Spezies beobachtet werden.

Die Transkripte der *PP2C* akkumulierten in *A. thaliana* schon nach Behandlung mit 50 µM Cu^{2+}. Die maximale Transkriptakkumulation wurde durch die Behandlung mit 500 µM Cu^{2+} erreicht. Dagegen konnte in *A. halleri* eine Induktion des Transkriptes erst ab 250 µM Cu^{2+} detektiert werden.

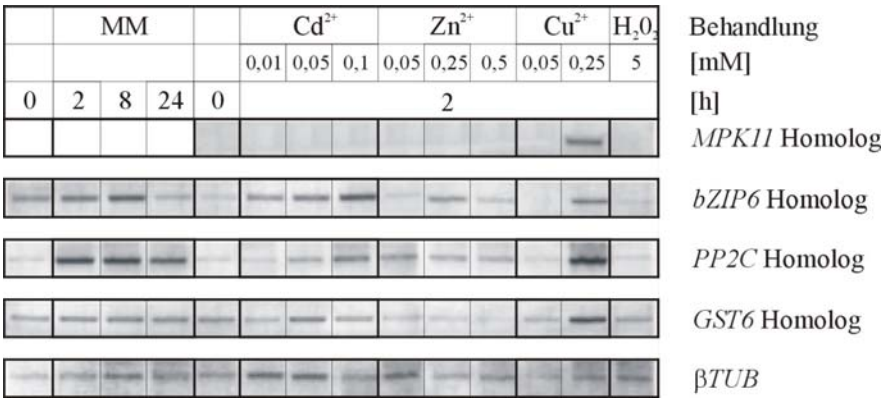


Abb. 3-4: RT-PCR-Analyse der Kandidatengene in *A. halleri*
Die Expression der Kandidatengene in *A. halleri* wurde mittels RT-PCR überprüft (n=2). Gesamt-RNA wurde aus flotierten Blättern nach entsprechenden Inkubationszeiten (h) und Behandlung mit einem Schwermetallgemisch (MM: 100 µM Cd^{2+}, 500 µM Zn^{2+}, 500 µM Cu^{2+}) sowie den einzelnen Schwermetallen (Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) mit unterschiedlichen Konzentrationen (mM) isoliert. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Anhang A aufgelistet.

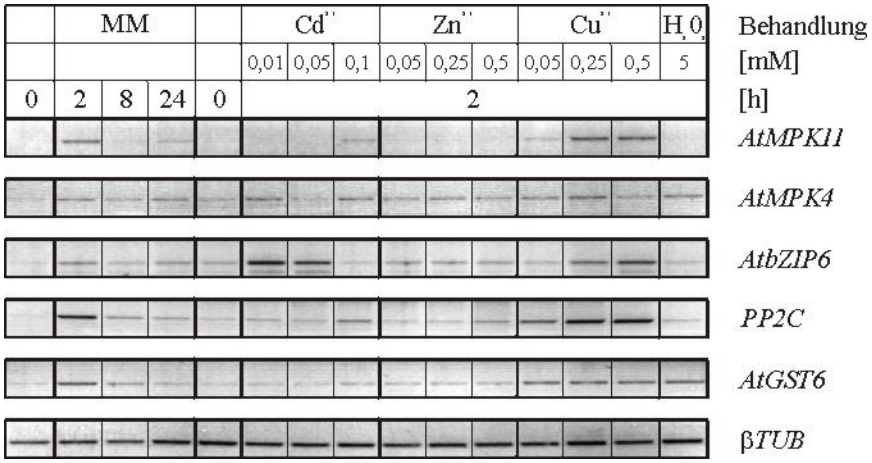


Abb. 3-5: RT-PCR-Analyse der Kandidatengene in *A. thaliana*
Die Expression der Kandidatengene in *A. thaliana* wurde mittels RT-PCR überprüft (n=2). Gesamt-RNA wurde aus flotierten Blättern nach entsprechenden Inkubationszeiten (h) und Behandlung mit einem Schwermetallgemisch (MM; 100 µM Cd^{2+}, 500 µM Zn^{2+}, 500 µM Cu^{2+}) und den einzelnen Schwermetallen (Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) mit unterschiedlichen Konzentrationen (mM) isoliert. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Anhang A aufgelistet.

Außerdem erfolgte eine schwache Induktion des *PP2C*-Transkriptes in *A. halleri* nach Behandlung mit 50 µM Cd^{2+}. Dagegen waren in *A. thaliana* erst 100 µM Cd^{2+} ausreichend, um eine Transkriptakkumulation der *PP2C* zu detektieren.
Eine leichte Transkriptakkumulation von *GST6* konnte in beiden *Arabidopsis*-Spezies nach der Behandlung mit Cu^{2+} beobachtet werden. Wie erwartet, erfolgte durch die Behandlung mit 5 mM H_2O_2 in beiden *Arabidopsis*-Spezies eine Akkumulation des *GST6*-Transkriptes.

3.1.3.4 Weiterführende Charakterisierung von *MPK11, bZIP6* und der *PP2C* durch die Behandlung mit biotischen und abiotischen Stressfaktoren

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Transkriptakkumulation der drei Gene um eine allgemeine oder eine schwermetallspezifische Stressantwort handelt, wurden flotierte Blätter von *A. thaliana* und von *A. halleri* für 2 h mit jeweils 400 mM Sorbitol, 150 mM NaCl, 150 µM Salicylsäure (SA) sowie 100 µM Methyljasmonat (MeJA) behandelt. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und die Transkriptakkumulation mittels RT-PCR analysiert. Nur in *A. thaliana* konnte nach Behandlung mit NaCl eine Transkriptakkumulation von *AtbZIP6* und *AtMPK11* beobachtet werden(Abb. 3-6).

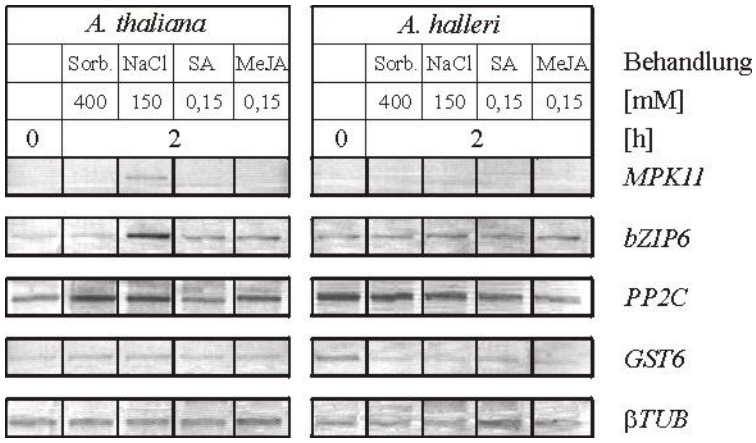


Abb. 3-6: Expressionsanalyse von *MPK11, bZIP6* und der *PP2C* nach der Behandlung mit biotischen und abiotischen Stressfaktoren

Gesamt-RNA wurde aus flotierten Blättern von *A. halleri* und *A. thaliana*, die für 2 h mit 400 mM Sorbitol (Sorb.), 150 mM NaCl, 100 µM Salicylsäure (SA) und 100 µM Methyljasmonat (MeJA) inkubiert wurden, isoliert. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Anhang A aufgelistet (n=3).

3.1.3.5 Analyse der Expression der Kandidatengene in Abhängigkeit von der eingesetzten Cu^{2+}-Konzentration

Bereits in Kap. 3.1.3.1.1 wurde die Abhängigkeit der Transkriptakkumulation von steigenden Cu^{2+}-Konzentrationen beschrieben. Es sollte nun überprüft werden, ob im Konzentrationsbereich zwischen 1 µM und 250 µM ebenfalls eine Abhängigkeit der Transkriptmenge von den eingesetzten Cu^{2+}-Konzentrationen besteht. Dazu wurden flotierte Blätter von *A. thaliana* mit unterschiedlichen Cu^{2+}-Konzentrationen für 2 h behandelt und mittels RT-PCR analysiert.

Für die untersuchten Transkripte konnte eine Abhängigkeit der Expression von der eingesetzten Cu^{2+}-Konzentration beobachtet werden.

Die Induktion des *MPK11*- und *bZIP6*-Transkripts erfolgte ab einer Cu^{2+}-Konzentration von 10 µM. Dagegen waren bereits Cu^{2+}-Konzentrationen von 1 µM bis 5 µM ausreichend, um die Transkriptakkumulation der *PP2C* und der *GST6* zu induzieren (Abb. 3-7).

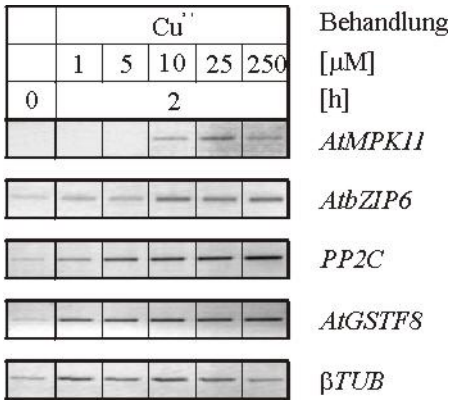


Abb. 3-7: RT-PCR-Analyse der Expression der Kandidatengene in Abhängigkeit von der Cu^{2+}-Konzentration
Gesamt-RNA wurde aus flotierten Blättern nach 2 h Inkubationszeit und Behandlung mit unterschiedlichen Cu^{2+}-Konzentrationen (1, 5, 10, 25 und 250 µM) isoliert. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Anhang A aufgelistet (n=2).

3.1.3.6 Analyse der schwermetallspezifischen Expression in Spross- und Wurzelgewebe

Um eine wurzelspezifische bzw. sprossspezifische Expression der Gene untersuchen zu können, wurden hydroponisch angezogene *A. thaliana*-Pflanzen (Kap. 2.2.2) mit den entsprechenden Schwermetallen behandelt. Dabei wurden 10 µM Cd^{2+}, 10 µM Cu^{2+} bzw, 50 µM Zn^{2+} eingesetzt. Die Untersuchung der Expression mittels RT-PCR erfolgte im Wurzelgewebe nach 2 h und im Sprossgewebe nach 24 h. Dieser späte Zeitpunkt wurde gewählt, um den Pflanzen den Transport der Schwermetalle in den Spross zu ermöglichen.
Die RT-PCR-Analyse von isolierter Gesamt-RNA zeigte, dass alle untersuchten Transkripte ein schwermetallspezifisches Expressionsmuster in Wurzel- und Sprossgewebe besaßen (Abb. 3-8).
Eine Transkriptakkumulation von *AtMPK11* erfolgte im Spross ausschließlich durch Cd^{2+}. Im Wurzelgewebe war neben Cd^{2+} auch Cu^{2+} in der Lage, eine Transkriptakkumulation von *AtMPK11* hervorzurufen.
Im Gegensatz dazu erfolgte eine verstärkte Transkriptakkumulation des *bZIP6* im Spross durch Zn^{2+} und Cu^{2+} aber nicht durch Cd^{2+}. Im Wurzelgewebe war Cu^{2+} in der Lage, das Transkript von *AtbZIP6* am stärksten zu induzieren. Eine schwächere Transkriptakkumulation konnten durch Zn^{2+} und Cd^{2+} detektiert werden.
Das Transkript der *PP2C* zeigte im Spross nach Behandlung mit den genannten Schwermetallen eine schwache Induktion. Dabei war die Transkriptakkumulation der *PP2C* nach Behandlung mit Zn^{2+} im Gegensatz zu Cd^{2+} und Cu^{2+} etwas stärker ausgeprägt. Interessanterweise war Cu^{2+} im untersuchten Wurzelgewebe in der Lage, das Transkript der *PP2C* sehr stark zu induzieren. Eine schwache Induktion zeigte sich nach der Behandlung mit Zn^{2+}.

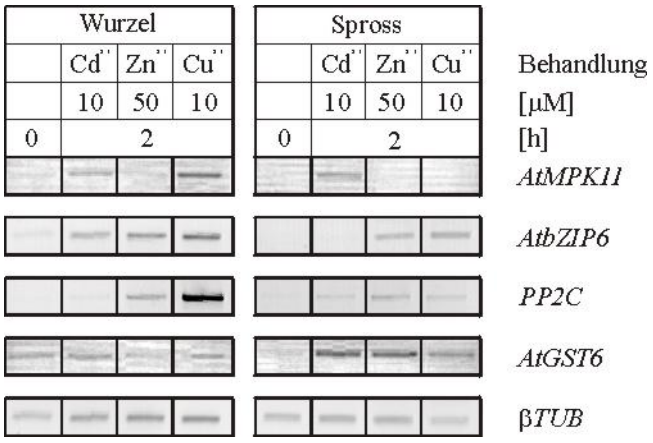


Abb. 3-8: Schwermetallspezifische Expression der Kandidatengene in unterschiedlichen Geweben von *A. thaliana*

Aus hydroponisch angezogenen *A. thaliana*-Pflanzen wurde aus Wurzel- und Sprossgewebe Gesamt-RNA isoliert. Die Pflanzen wurden für die Wurzelproben für 2 h, für die Sprossproben für 24 h mit 10 µM Cd^{2+}, 10 µM Cu^{2+} bzw. 50 µM Zn^{2+} behandelt. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Anhang A aufgelistet (n=2).

3.1.3.7 Charakterisierung weiterer cDNA-AFLP-Klone mittels Makroarray

Um die schwermetallspezifische Expression weiterer, aus der cDNA-AFLP-Anaylse stammender Klone zu untersuchen, wurde die Methode der Filterhybridisierung (Makroarray) benutzt.

Wie bereits in Kap. 3.1.2.2 beschrieben, wurden pro cDNA-AFLP-Fragment vier unabhängige Klone sequenziert. Da eine Analyse aller erhaltenen Klone mittels RT-PCR wenig sinnvoll erschien, wurden nach dem Zufallsprinzip 43 verschiedene Klone unabhängig von ihrer Sequenzhomologie zu Proteinen bekannter Funktion ausgewählt und auf einen Filter punktförmig aufgetragen (Kap. 2.13). Daneben wurden aus *A. thaliana* konstitutive Kontrollgene sowie Gene der Glutathionbiosynthese und durch oxidativen Stress induzierte Gene aufgetragen.

Anschließend wurden hydroponische Kulturen von *A. thaliana* und *A. halleri* für 2 h mit jeweils 10 µM Cd^{2+}, 10 µM Cu^{2+} und 5 mM H_2O_2 behandelt und Gesamt-RNA aus dem Wurzelgewebe isoliert. Die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA wurde als Sonde zur Hybridisierung der Filter verwendet (Kap2.13). Trotz der hohen Sequenzidentität zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* war der Einsatz heterologer Sonden nur begrenzt möglich, da das Signal zu Hintergrundverhältnis eine Analyse der Signale nicht ermöglichte (Daten nicht gezeigt).

Die vollständige Auswertung des Makroarray-Experiments ist in Anhang E dargestellt.

Dabei waren die verwendeten konstitutiven Kontrollen geeignet, um Aussagen zur Induzierbarkeit der untersuchten Gene zu treffen.

Im Folgenden werden die Expressionsmuster einiger erhaltener, differenziell exprimierter Gene beschrieben. So konnte für das *A. halleri*-Homolog von *AtGSH2* eine mehr als vierfache Induktion des Transkriptes durch Cu^{2+} beobachtet werden (Abb. 3-9 A, B). Das *A. halleri*-Homolog zu *AtMT2* akkumulierte mehr als vierfach nach Behandlung mit Cd^{2+} (Abb. 3-9 A, C). Klon 46,2 und 52,4 zeigten Homologien zur Sequenz eines Harpin-induzierbaren Proteins aus *A. thaliana* (At5g06330).

Ihre Transkripte akkumulierten nach Behandlung mit Cu^{2+} mehr als 20-fach in Wurzeln (Abb3-9 A, B) und fünf- bis elffach nach Behandlung mit Cd^{2+} (Abb. 3-9 A, C). Auch oxidativer Stress, ausgelöst durch H_2O_2, führte zu einer Erhöhung der Transkriptmenge (Abb. 3-9 A, D). Die Transkriptmenge des *A. halleri*-Homologs zu *AtAPR2* stieg nach oxidativer Stressbehandlung mehr als sechsfach an (Abb. 3-9 A, D). *AtAPR2* kodiert für die Adenosin 5'-Phosphosulfat Reduktase, das Schlüsselenzym für die assimilatorische Schwefelreduktion in Pflanzen (Weber *et al*., 2000).
Insgesamt konnte für 15 der untersuchten Klone eine differenzielle Expression gezeigt werden. Damit stellt die Methode des Makroarray eine geeignete Variante zur Identifizierung schwermetallregulierter Gene dar.

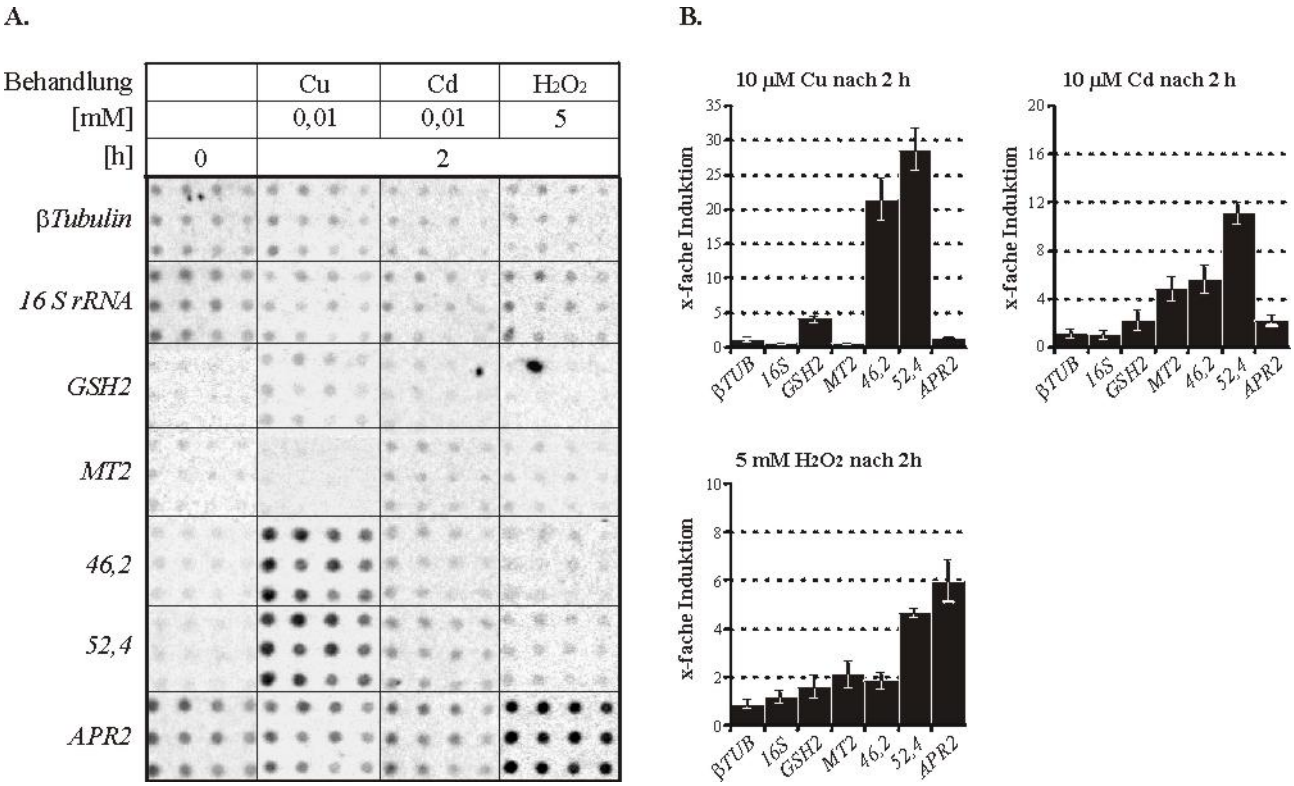


Abb. 3-9: Makroarray-Analyse von cDNA-AFLP-Klonen in schwermetallbehandeltem Wurzelgewebe von *A. halleri*

Hydroponische Kulturen von *A. halleri* wurden für 2 h mit 25 µM Cd^{2+} bzw. 10 µM Cu^{2+} oder 5 mM H_2O_2 behandelt und daraus Gesamt-RNA isoliert. cDNA wurde aus 10 µg Gesamt-RNA synthetisiert und radioaktiv markiert. In A sind die Hybridisierungsmuster für ausgewählte Gene dargestellt. In den Diagrammen ist die Quantifizierung der Induktion nach Behandlung mit Cu^{2+} (B), Cd^{2+} (C) und H_2O_2 (D) dargestellt.

3.1.4 Identifizierung schwermetallregulierter ABC-Transporter mittels Mikroarrays

Zu den letzten Schritten der Cd^{2+}-Detoxifizierung in Pflanzen zählt der Transport der gebildeten niedermolekularen Cd-Phytochelatinkomplexe in die Vakuole. Dieser Transportprozess wird durch ABC-Transporter vermittelt (Vögeli-Lange *et al*., 1990; Salt und Rauser, 1995). Allerdings konnte in Pflanzen bisher noch kein entsprechender ABC-Transporter identifiziert werden (Sanchez-Fernandez *et al*., 2001). Da für fast alle Schritte der Cd^{2+}-Detoxifizierung, beginnend mit der

Schwefelassimilation, über die Glutathionbiosynthese sowie der Phytochelatinsynthese, eine transkriptionelle Aktivierung durch Cd^{2+} gezeigt werden konnte (Heiss *et al*., 1999; Harada *et al*., 2002; Xiang und Oliver, 1998; Lee und Korban, 2002; Clemens *et al*., 1999), sollten in einer Kooperation mit Prof. Enrico Martinoia (Unversität Zürich, Schweiz) und Dr. Lucien Bovet (Universität Neuchâtel, Schweiz) mögliche ABC-Transporter für diesen letzten Detoxifizierungsschritt mit Hilfe von Mikroarrays (Kap. 2.14.1) identifiziert werden. Dazu wurden hydroponische Kulturen von *A. thaliana* und *A. halleri* für 2 h mit 10 µM Cd^{2+} behandelt und Gesamt-RNA aus Wurzelgewebe isoliert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Kulturen beider *Arabidopsis*-Spezies. Die Hybridisierung der Mikroarrays erfolgte wie in Kap. 2.14.1 beschrieben durch fluoreszenzmarkierte cDNA.

Zunächst war von Interesse, welche ABC-Transporter in *A. thaliana* bzw. *A. halleri* durch Behandlung mit Cd^{2+} induziert werden. Außerdem wurden die Expressionsmuster der unbehandelten und der Cd^{2+}-behandelten Proben beider *Arabidopsis*-Spezies miteinander verglichen. Diese Analyse diente der Identifizierung von ABC-Transportern, die eine mögliche Rolle in der Detoxifizierung von Cd^{2+} spielen und damit an einer erhöhten Toleranz gegenüber Cd^{2+} von *A. halleri* gegenüber *A. thaliana* beteiligt wären.

In *A. halleri* konnten nach Auswertung der Mikroarraydaten (Kap. 2.14.1) keine Unterschiede im Expressionsmuster der ABC-Transporter nach Cd^{2+}-Behandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte in *A. thaliana* eine mehr als 2-fach höhere Transkriptakkumulation des ABC-Transporters *WBC15* („**W**hite **B**rown **C**omplex 15“) detektiert werden (Abb. 3-10 A, B). Bei *AtWBC15* handelte es sich um einen ABC-Transporter, der sich wie HMT1 durch sechs putative Transmembrandomänen auszeichnet (Sanchez-Fernandez *et al*., 2001).

Der Vergleich der erhaltenen Mikroarraydaten der beiden *Arabidopsis*-Spezies ergab nur zwei signifikante Unterschiede.

Die Glutathion-S Transferase *AtERD13* („**E**arly-**R**esponsive to **D**ehydration stress 13“) war in *A. thaliana* konstitutiv um den Faktor zwei stärker exprimiert (Abb. 3-10 C, D). Daneben zeigte auch *AtWBC15* nach Cd^{2+}-Behandlung eine zweifach erhöhte Expression in *A. thaliana* (Abb. 3-10 D). Berechnet man für jedes Gen die Expressionsdifferenz zwischen den vergleichenden Experimenten, so zeigte sich, dass durch die Cd^{2+}-Behandlung nur *AtWBC15* ein stark verändertes Expressionsmuster im Vergleich zwischen den Spezies aufwies. So wurde eine fast vierfache Induktion von *AtWCB15* in *A. thaliana* nach Cd^{2+}-Behandlung im Vergleich zu *A. halleri* nach Cd^{2+}-Behandlung beobachtet (Abb. 3-10 E).

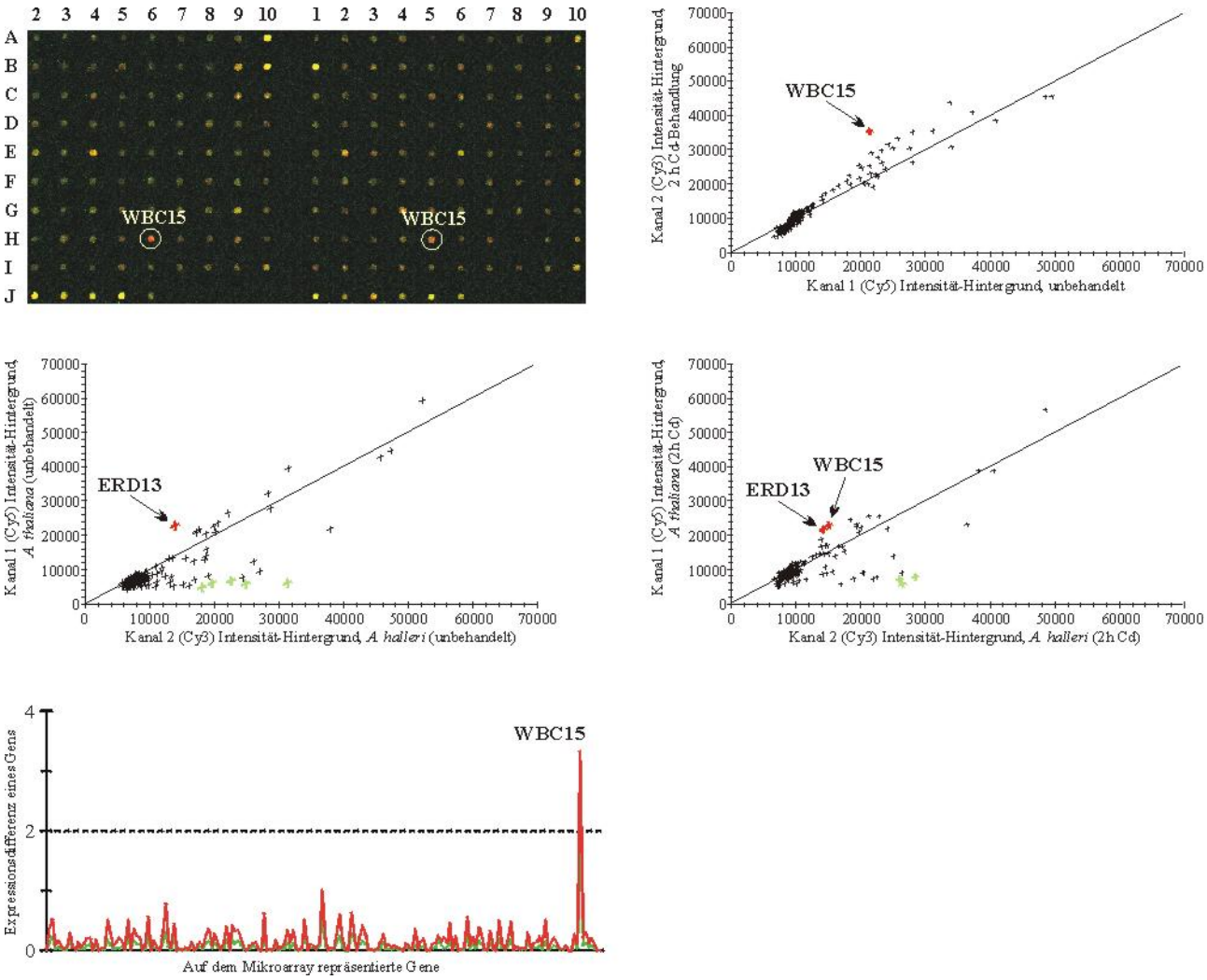


Abb. 3-10: Auswertung der ABC-Transporter-Mikroarrays
In (A) ist ein Ausschnitt des ABC-Transporter-Mikroarrays dargestellt. In diesem Experiment wurden unbehandeltes und Cd^{2+}-behandeltes Wurzelgewebe von *A. thaliana* miteinander verglichen. Gelbe Spots repräsentieren Gene mit unveränderter Expression, grüne Spots zeigen Gene, die durch Cd^{2+} reprimiert sind und rote Spots zeigen Gene, die durch Cd^{2+} induziert sind. Die Expression kann in Verteilungsdiagrammen dargestellt werden (B-D). Rote Kreuze markieren Gene, die mehr als zweifach induziert sind, grüne Kreuze Gene, die mehr als zweifach reprimiert sind und schwarze Kreuze Gene mit unveränderter Expression. In (B) ist der Vergleich von unbehandeltem und Cd^{2+}-behandeltem Wurzelgewebe aus *A. thaliana* dargestellt. In (C) wurde unbehandeltes Wurzelgewebe aus *A. thaliana* und *A. halleri* miteinander verglichen und in (D) Cd^{2+}-behandeltes Wurzelgewebe aus *A. thaliana* und *A. halleri*. In (E) ist die Expressionsdifferenz der auf dem Mikroarray repräsentierten Gene dargestellt. In rot ist die Differenz des Vergleichs der *A. thaliana*- und *A. halleri*-Experimente, in grün ist die Differenz des Vergleichs der Kontroll- und Cd^{2+}-Experimente dargestellt.

3.2 Weiterführende Untersuchungen zu *AtbZIP6*

Neben der Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von *AtbZIP6* durch Schwermetalle erfolgte die computergestützte Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz, um mögliche regulatorische Domänen zu identifizieren.

Die aus der 684 bp langen Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz (Abb. 3-11) bestand aus 227 Aminosäuren und war durch verschiedene Domänen charakterisiert. In einem

langen N-terminalen Abschnitt (AS 1-130) wurden drei mögliche prolinreiche Domänen (PRD I – III), die auch reich an aromatischen Aminosäuren waren, identifiziert. In der Mitte der Sequenz konnte die für G-Box-bindende Transkriptionsfaktoren charakteristische basische bZIP-Domäne (AS 131-148) identifiziert werden (Siberil *et al.*, 2001). Die Kernsequenz der bZIP-Domäne umfasste ein Kernlokalisierungssignal mit der Konsensussequenz B-R-K-X_{12}-B-X-B-K (B: basische AS). Die Charakterisierung der ebenfalls in der Kernsequenz lokalisierten Serylreste erfolgte computergestützt mittels PROSITE (Falquet *et al.*, 2002). Dabei wurden die Konsensussequenzen um die Serylreste analysiert und ergaben für Serylrest 136 eine mögliche Kaseinkinase II-Phosphorylierungsstelle und für Serylrest 140 eine mögliche ProteinkinaseC-Phosphorylierungsstelle. Zusätzlich konnte für Serylrest 136 eine mögliche 14-3-3 Protein-Bindedomäne identifiziert werden.

Abb. 3-11: Aminosäuresequenz von AtbZIP6
In lachsfarbener Schrift sind die prolinreichen Domänen (PRD) eingezeichnet. In der bZIP-Domäne befindet sich das Kernlokalisierungssignal (grüne Schrift). Phosphorylierungsstellen sind grün unterlegt Die Scharnierregion ist in blauer Schrift dargestellt. Die für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäuren im Leucin-Zipper sind gelb markiert und pink unterlegt, konservierte Aminosäuren der Leucin-Zipper-Region sind pink dargestellt. Die dreifache Wiederholung von Histidylresten am C-Terminus ist hellgrün eingefärbt.

Im Anschluss an die Scharnierregion (AS 149-154) folgte ein Leucin-Zipper, der sich aus acht, durch jeweils sechs AS getrennte, Leucylreste oder hydrophobe AS mit folgender Konsensussequenz **L**-X_3-A-X_2-**L**-X_3-N-X_2-**L**-X_3-L-X_2-**V**-X_3-I-X_2-**M**-X_3-N-X_2-**L**-X_6-**L**-X_6-**M** zusammensetzte (die Leucinzipper bildenden AS sind fett gedruckt dargestellt). Am C-Terminus wurden drei Histidylreste (AS 223-225) identifiziert. Aufgrund der identifizierten Domänen und der Größe wurde *AtbZIP6* in die Gruppe S der bZIP-Transkriptionsfaktoren eingeteilt (Jakoby *et al.*, 2002).

3.2.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten von *AtbZIP6*

Bereits in Kap. 3.1.3.3 wurde die schwermetallspezifische Regulation der *AtbZIP6*-Expression gezeigt. Durch die Identifizierung von T-DNA-Insertionslinien sollte in anschließenden Analysen die Beteiligung von AtbZIP6 in der Schwermetallhomöostase und/oder -signaltransduktion geprüft werden. Dabei sollten Veränderungen im Phänotyp sowie Veränderungen im Transkriptom und/oder Proteom Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von AtbZIP6 ermöglichen.

Die Suche und Identifizierung möglicher T-DNA-Insertionslinien erfolgte zusammen mit der „Arabidopsis Knock-out Facility“ der Universität von Madison/Wisconsin (USA). In einer ersten „Screening“-Runde wurden insgesamt 133.440 unabhängige T-DNA-Insertionslinien mittels PCR analysiert. Diese unabhängigen Linien setzen sich aus zwei Populationen zusammen: 60.480 kanamycinresistente T-DNA-Insertionslinien (Krysan *et al*., 1999), die im folgenden als Alpha-Population bezeichnet werden und 72.960 unabhängige T-DNA-Insertionslinien, die gegen das Herbizid Basta resistent sind und mit einem Aktivierungs-Tag versehen sind (Weigel *et al*., 2000). Diese Linien werden im folgenden als Basta-Population bezeichnet. Die Suche nach möglichen Insertionen in der genomischen Region 500 bp stromauf- und stromabwärts der Sequenz von *AtbZIP6* erfolgte mittels PCR auf genomische DNA mit spezifischen Primern (Sequenzen siehe Anhang A). Die Auswertung der PCR erfolgte mittels Southern-Analyse.
Insgesamt zeigten elf Pools der Alpha-Population und 13 Pools der Basta-Population Hybridisierungssignale. Die Insertionsstellen der T-DNA wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte ermittelt. Aus der Basta-Population konnten zwei unabhängige Insertionen in der kodierenden Sequenz von *AtbZIP6* nachgewiesen werden (Tab. 3-5). In weiteren „Screening“-Runden konnten für beide unabhängigen T-DNA-Insertionen Einzelpflanzen isoliert werden.

Tab. 3-5: Insertionen in der genomischen Region von *AtbZIP6*

Angegeben sind die Nummern der „Superpools“ und der verwendete spezifische Primer für *AtbZIP6* (RB: 500 bp 3‘ des Stopkodons, LB: 500 bp 5‘ des Startkodons). Die Position der Insertion bezieht sich auf den *A. thaliana* BAC-Klon T20K9. Die kodierende Sequenz von *AtbZIP6* liegt bei 28.304 bp – 29.252 bp. Insertion im kodierenden Bereich von *AtbZIP6* sind grau unterlegt. Linien, für die keine Sequenzdaten erhalten werden konnten, sind mit n. d. gekennzeichnet.

Alpha-Population „Superpool“-Nummer	Position	Basta-Population „Superpool“-Nummer	Position
RB # 13	n. d.	RB # 5	n. d.
LB # 3	n. d.	RB # 13	n. d.
LB # 5	n. d.	RB # 17	28.445 bp
LB # 13	n. d.	RB # 19	n. d.
LB # 15	n .d.	RB # 37	28.370 bp
LB # 19	31.502 bp	LB # 1	n. d.
LB # 20	29.013 bp	LB # 2	n. d.
LB # 22	n. d.	LB # 7	n. d.
LB # 23	31.993 bp	LB # 17	28.421 bp
LB # 29	n. d.	LB # 27	n. d.
LB # 30	n. d.	LB # 34	n. d.
		LB # 37	28.344 bp

3.2.2 Untersuchungen zum Genotyp der identifizierten T-DNA-Insertionslinien

Zur Analyse des Genotyps wurde genomische DNA aus einzelnen Pflanzen der unabhängigen T-DNA-Insertionslinien isoliert und mittels PCR untersucht. In der PCR wurde eine Kombination aus

drei spezifischen Primern eingesetzt, die Aufschluss über vorhandene *bZIP6* Wildtyp- oder Mutantenallele geben sollten.

Die Sequenzanalyse des Mutantenallels Linie #17 ergab, dass es sich bei der Insertion um eine Tandeminsertion handelt. Dabei inseriert die erste T-DNA 117 bp stromaufwärts des Startkodons, die zweite T-DNA inseriert revers komplementär 141 bp stromaufwärts des Startkodons. Daher erfolgte die Analyse der genomischen DNA mit zwei genspezifischen (bZIPL, bZIPR) und einem T-DNA-spezifischen Primer (JL202). In Wildtyp-Pflanzen (WT und H5O) wurde ein 1,4 kb großes Fragment amplifiziert, in heterozygoten Pflanzen (A5, G1 und H5U) wurden mindestens drei Fragmente amplifiziert, ein 1,4 kb Wildtypfragment und zwei Fragmente (0,7 kb und 0,4 kb), die spezifisch für die Insertion waren. In Pflanzen, die homozygot für die Insertion waren, wurden zwei Banden mit 0,7 kb und 0,4 kb detektiert (B1).

Nur aus einer unabhängigen T-DNA-Insertionslinie konnte eine für das Mutantenallel homozygote Pflanze isoliert werden. Dabei handelte sich um die Pflanze B1 (Abb. 3-12).

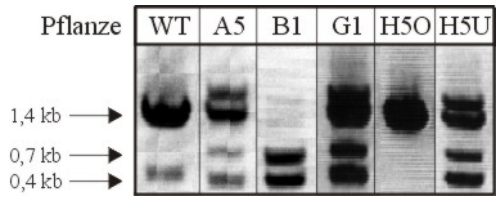


Abb. 3-12: Genotypische Untersuchungen zur Insertion in *AtbZIP6* mittels PCR

Die Untersuchung der Allele für *AtbZIP6* erfolgte mittels einer PCR auf genomische DNA. Bei der PCR wurden zwei genspezifische (bZIPL, bZIPR) und ein T-DNA-spezifischer Primer (JL202) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der Primer sind in Anhang A aufgelistet.

3.2.3 RT-PCR-Analyse der B1-*AtbZIP6*-Pflanzen

Um den homozygoten Genotyp zu bestätigen, wurde aus flotierten Blättern von WS-Wildtyp- und B1-Pflanzen nach Behandlung für 2 h mit 250 µM Zn^{2+}, 50 µM Cd^{2+} und 250 µM Cu^{2+} Gesamt-RNA isoliert und die Transkriptakkumulation von *AtbZIP6* mittels RT-PCR untersucht.

Im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp konnte in den homozygoten B1-Pflanzen kein Transkript detektiert werden (Abb. 3-13). Somit handelt es sich bei der B1-Pflanze um einen Knockout des *bZIP6*-Gens. Im folgenden werden die B1-Pflanzen als *bZIP6-1*-Mutanten bezeichnet.

Abb. 3-13: RT-PCR-Analyse der homozygoten *AtbZIP6*-T-DNA-Insertionslinie B1

RT-PCR-Analyse flotierter, für 2 h schwermetallbehandelter *A. thaliana* Blätter (250 µM Zn^{2+}, 50 µM Cd^{2+} und 250 µM Cu^{2+}) der homozygoten Δ*bzip6* B1-Linie und von WS-Wildtyp-Pflanzen. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für *AtbZIP6* erfolgte mit 40 Zyklen. Die Kontrolle der Effizienz der reversen Transkription erfolgte mit β-Tubulin. Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind in Anhang A aufgelistet.

3.2.4 Untersuchungen möglicher Phänotypen von *bzip6-1*

Der Vergleich zwischen *bzip6-1* und WS-Wildtyp ergab keine sichtbaren Unterschiede in der Wuchsform oder dem äußeren Erscheinungsbild der Pflanzen. Keimungsexperimente auf MS-Medium (Kap. 2.1.2) mit unterschiedlichen Cd^{2+}- und Cu^{2+}-Konzentrationen zeigten keine Veränderung im Wurzelwachstum zwischen Mutante und Wildtyp. Allerdings wurde beobachtet, dass die Mutanten auf Cu^{2+}-haltigem Medium chlorotischere Blätter entwickelten als der entsprechende Wildtyp. Diese Beobachtung konnte durch Chlorophyllbestimmungen (Kap. 2.18) bestätigt werden (Abb. 3-14).

Nach Behandlung hydroponisch angezogener *bzip6-1*-Pflanzen mit 10 µM Cu^{2+} über einen Zeitraum von 24 h konnte eine Verschiebung im Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion im Wurzelgewebe beobachtet werden (Dr. Emiko Harada, IPB Halle, persönliche Mitteilung).

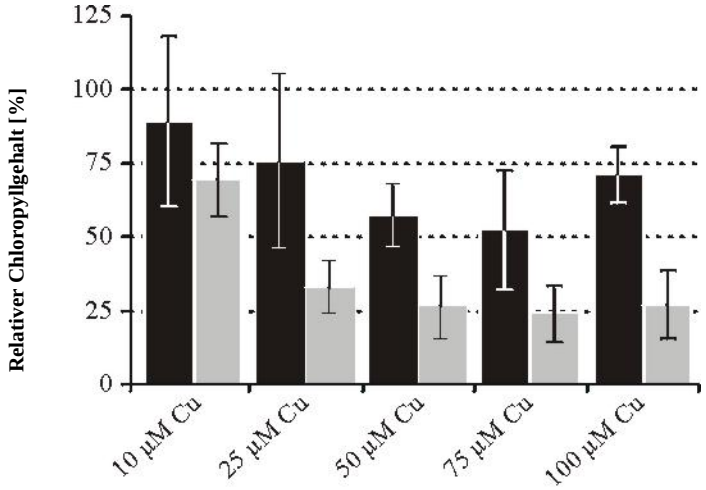


Abb. 3-14: Chlorophyllbestimmung sieben Tage alter Keimlinge von *bzip6-1* und WS-Wildtyp

Samen von *bzip6-1*-Pflanzen (graue Balken) und WS-Wildtyp (schwarze Balken) wurden auf MS-Medium angezogen, das mit verschiedenen Cu^{2+}-Konzentrationen supplementiert wurde. Nach einer Woche wurde der Chlorophyllgehalt bestimmt (n=2). Auf der Y-Achse ist der relative Chlorophyllgehalt bezogen auf unbehandelte Keimlinge dargestellt.

3.2.5 Untersuchungen zur Auswirkung der Insertion auf das Transkriptom

Um die Einflüsse des Transkriptionsfaktors *AtbZIP6* auf die Regulation einzelner Gene in *A. thailana* zu untersuchen und so etwas über seine mögliche Rolle in der Schwermetallhomöostase zu erfahren, wurden Affymetrix „GeneChip® Arabidopsis Genome Arrays“ verwendet. Dazu wurde aus dem Wurzelgewebe und dem Spross hydroponisch angezogener *bzip6-1*- und WS-Wildtyp-Pflanzen Gesamt-RNA isoliert. Die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA wurde in „antisense“-RNA umgeschrieben und anschließend zur Hybridisierung der Mikroarrays eingesetzt (Kap. 2.14.2).

In jeweils zwei unabhängigen Experimenten wurden die Wurzelproben bzw. die Sprossproben der *bZIP6-1*-Pflanzen mit denen des entsprechenden Wildtyps verglichen. Bei der Auswertung wurden nur Gene berücksichtigt, deren Expression in der Mutante um einen Faktor von mindestens zwei reduziert waren, eine maximale Standardabweichung von 50 % der gemittelten Expression besaßen und mit „*present*“ (Kap. 2.14.2) gekennzeichnet wurden. Außerdem wurden alle Gene berücksichtigt, die in der Mutante als „*absent*“ und im Wildtyp als „*present*“ gekennzeichnet wurden und deren Expression zusätzlich um den Faktor zwei in der Mutante reduziert war.

Die Auswertung der Wurzelexperimente ergab insgesamt 16 zumeist stressreponsive Gene, die in unbehandelten Mutanten mehr als zweifach reprimiert waren. Dazu gehörten u. a. Thioredoxin (At1g45145), eine Glutathion-S-Transferase (At4g02520) und ein putatives Calmodulin (At2g41100) (Tab. 3-6).

In den Sprossproben entsprachen insgesamt 32 Gene den gewählten Kriterien. Unter diesen Genen befand sich auch *AtbZIP6*, der wie erwartet in der Mutante mit „*absent*“ und im Wildtyp mit „*present*“ gekennzeichnet war.

Die reprimierten Gene konnten in folgende Klassen eingeordnet werden: stressresponsive Gene (10), Transporter (10), Gene der transkriptionellen Kontrolle (5) und Signalperzeption und -transduktion (4) sowie 3 Gene mit unbekannter Funktion (siehe Tab. 3-7).

Tab. 3-6: Analyse der Mikroarray-Experimente in Wurzeln von *bzip6*-1- und Wildtyp-Pflanzen

Unbehandeltes Wurzelgewebe von *bzip6-1*- und WS-Wildtyp-Pflanzen wurde mittels Affymetrix-Mikroarray auf Unterschiede im Transkriptom analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und Standardabweichungen (Stabw) von je zwei unabhängigen Experimenten, sowie die daraus resultierende Induktion. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die mindestens um den Faktor zwei reprimiert waren. Die Zuordnung der AGI-Codes und Ermittlung einer möglichen Funktion erfolgten mittels einer Affymetrix-internen Identifikationsnummer (Affy ID; Ghassemian *et al*., 2001). In A. sind alle Gene dargestellt, die sowohl im WT, als auch in der Mutante mit „present“ gekennzeichnet wurden. In B. sind alle Gene dargestellt, die in der Mutante mit „absent“ und im WT mit „present gekennzeichnet wurden. Die reprimierten Gene wurden anschließend in Klassen eingeordnet: Stressantwort (S), unbekannte Funktion (U), Primärmetabolismus (M) und Transport (T). Die Analyse der Promotorsequenzen (500 bp stromaufwärts des Startkodons) ergab drei konservierte Promotorelemente (E1, E2, E3). Mit (+) sind die Sequenzen gekennzeichnet, die auf dem kodierenden Strang der genomischen DNA liegen, mit (-) sind alle Sequenzen gekennzeichnet, die auf dem komplementären Strang liegen.

A.

Mittel Int. Δ*bzip6*	Stabw	Mittel Int. Ws-WT	Stabw	Indu ktion	Affy ID	AGI-code	Funktion	Einteilung	Pos. E 1 [bp]	Pos. E 2 [bp]	Pos. E 3 [bp]
2940	136	9423	601	0,31	13189_s_at	At1g45145	Thioredoxin	S	212 (+)	445 (+)	
3306	1157	7930	1891	0,42	15115_f_at	At2g05380	unbekannte Funktion	U	120 (+)	236 (+)	
14719	2502	43162	11397	0,34	15118_s_at	At4g02520	Glutathion-S-Transferase	S	361 (+)	145 (-)	
5267	230	12340	1314	0,43	15690_f_at	At2g16600	Zyklophilin	M	310 (+)	480 (-)	410 (+)
2809	436	7600	59	0,37	16981_s_at	At1g45145	Thioredoxin	S	212 (+)	445 (+)	
1921	3	5530	1055	0,35	14491_at	At2g43530	putativer Trypsin Inhibitor	S	457 (+)		
764	98	1570	116	0,49	14513_s_at	At2g42690	putative Lipase	S	294 (-)	133 (+)	
1464	100	4581	1160	0,32	14636_s_at	At1g75040	Thaumatin	S	357 (+)	478 (+)	
518	42	1620	241	0,32	16439_at	At1g31580	unbekannte Funktion	U	2 (-)	276 (-)	
4495	174	10390	2060	0,43	18264_at	At2g26500	unbekannte Funktion	U	372 (+)	485 (-)	
4287	511	17772	6725	0,24	19848_s_at	At2g41100	calmodulin-like protein	S	278 (+)	238 (-)	
4892	1661	18329	6292	0,27	17499_s_at	At2g46430	AtCNGC3	T	99 (-)		337 (+)
8378	3692	20689	6634	0,40	13187_i_at	At1g45145	Thioredoxin	S	212 (+)	445 (+)	
1995	1006	5497	2351	0,36	17187_at	At4g08870	putative Arginase	M	11 (+)	308 (-)	177 (+)

B.

Mittel Int. Δ*bzip6*	Stabw	Mittel Int. Ws-WT	Stabw	Indu ktion	Affy ID	AGI-code	Funktion	Einteilung	Pos. E 1 [bp]	Pos. E 2 [bp]	Pos. E 3 [bp]
135	0	466	0	0,29	14074_at	At1g04290	unbekannte Funktion	U	402 (-)	363 (+)	
180	40	457	63	0,39	19191_at	At4g39540	Shikimate Kinase	M	293 (-)	127 (-)	232 (+)
110	61	281	31	0,39	17351_at	At2g13560	Malat Oxidoreduktase	M	364 (+)	313 (-)	
253	135	1016	236	0,25	20238_at	At3g13790	beta-Fruktofuranosidase 1	M	222 (+)	202 (-)	

Tab. 3-7: Analyse der Mikroarray-Experimente im Spross von *bzip6-1*- und Wildtyp-Pflanzen

Unbehandeltes Sprossgewebe von *bzip6-1*- und WS-Wildtyp-Pflanzen wurde mittels Affymetrix-Mikroarray auf Unterschiede im Transkriptom analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Signalintensitäten und Standardabweichungen (Stabw) von je zwei unabhängigen Experimenten, sowie die daraus resultierende Induktion. Es wurden nur Gene berücksichtigt, die mindestens um den Faktor zwei reprimiert waren. Die Zuordnung der AGI-Codes und Ermittlung einer möglichen Funktion erfolgten mittels einer Affymetrix-internen Identifikationsnummer (Affy ID; Ghassemian *et al*., 2001). In A. sind alle Gene dargestellt, die sowohl im WT, als auch in der Mutante mit „present" gekennzeichnet wurden. In B. sind alle Gene dargestellt, die in der Mutante mit „absent" und im WT mit „present gekennzeichnet wurden. Die reprimierten Gene wurden anschließend in Klassen eingeordnet: Stressantwort (S), unbekannte Funktion (U), Primärmetabolismus (M), Transport (T) und Transkriptionskontrolle (Tk). Die Analyse der Promotorsequenzen (500 bp stromaufwärts des Startkodons) ergab drei konservierte Promotorelemente (E4, E5, E6). Mit (+) sind die Sequenzen gekennzeichnet, die auf dem kodierenden Strang der genomischen DNA liegen, mit (-) sind alle Sequenzen gekennzeichnet, die auf dem komplementären Strang liegen.

A.

Mittel Int. Δ*bzip6*	Stabw	Mittel Int. Ws-WT	Stabw	Indu ktion	Affy ID	AGI-code	Funktion	Einteilung	Pos. E 4 [bp]	Pos. E 5 [bp]	Pos. E 6 [bp]
239	3	562	31	0,42	17002_at	At3g51600	Lipid-Transferprotein	T	329 (-)	448 (+)	308 (+)
572	38	1161	49	0,49	19713_at	At4g18340	beta-1,3-Glukanase	S	477 (+)		
726	11	1736	2	0,42	19977_at	At3g48360	vakuolärer Transport	T	313 (-)	373 (+)	
1093	281	2425	387	0,45	15491_at	At4g12360	Lipid-Transferprotein	T	213 (+)		
163	34	352	87	0,46	15918_at	At1g30750	unbekannte Funktion	U	397 (+)		22 (+)
4813	806	13630	1229	0,35	16615_s_at	At1g08090	Nitrat Transporter (NRT2)	T	93 (-)		
172	11	438	29	0,39	18149_s_at	At2g38490	Protein Kinase (AtCIPK22)	P	468 (+)	452 (-)	
2636	549	6089	936	0,43	18290_at	At1g49500	TonB-abhängiger Rezptor	P	122 (+)	95 (+)	
1777	418	4151	648	0,43	18701_s_at	At5g15960	Kälte und ABA ind. Protein	S	106 (+)		307 (+)
294	36	781	27	0,38	18836_at	At2g24710	Glutamat Rezeptor	P	120 (+)		
1672	647	3547	114	0,47	12169_i_at	At4g33960	unbekannte Funktion	U	325 (+)		
205	46	431	19	0,48	12453_at	At5g51890	Peroxidase	S	35 (-)	384 (-)	
249	64	593	12	0,42	13486_at	At1g30560	Glyzerol-3-P Permease	T	293 (-)	319 (-)	
929	280	1866	21	0,50	14350_at	At4g40070	Zn-Finger-Protein	Tk	173 (-)	231 (-)	487 (+)
180	7	440	90	0,41	16238_at	At4g16480	Transporter	T	297 (-)	446 (-)	
858	66	1875	497	0,46	16298_at	At4g21850	Trankriptionskontrolle	Tk	293 (+)	200 (+)	268 (+)
1618	308	3240	43	0,50	17100_s_at	At2g32300	Uclazyanin	S	287 (-)	482(-)	
1234	377	3010	477	0,41	17509_s_at	At4g08620	Sulfat-Transporter	T	49 (-)		
1868	744	3879	243	0,48	18970_at	At4g25790	PR-1	S	40 (+)		
507	36	1299	462	0,39	19878_at	At4g08290	Nodulin	S	277 (-)	3 (-)	
346	97	836	27	0,41	20593_at	At1g30990	Latex-Protein	S	455 (-)		
2094	1271	5544	918	0,38	12514_at	At4g19750	Chitinase	S	300 (+)		
901	435	1861	51	0,48	14047_g_at	At2g47160	Anionen-Austauscher	T	353 (+)		
1124	630	2565	106	0,44	15021_at	At4g25220	Glyzerol-3-P Permease	T	286 (-)	307 (-)	
249	15	697	322	0,36	15370_at	At4g16380	unbekannte Funktion	U			
3348	1654	7452	679	0,45	16630_s_at	At4g25820	Glukanase	S	102 (-)		

B.

Mittel Int. Δ*bzip6*	Stabw	Mittel Int. Ws-WT	Stabw	Indu ktion	Affy ID	AGI-code	Funktion	Einteilung	Pos. E 4 [bp]	Pos. E 5 [bp]	Pos. E 6 [bp]
119	16	291	99	0,41	12035_at	At1g79130	Auxin ind. Protein	S	456 (+)	436 (-)	
89	15	199	40	0,45	15480_at	At3g52490	Hitzeschock-Protein	S	263 (+)	302 (-)	
77	24	261	52	0,30	19781_at	At4g19150	Ankyrin	Tk	463 (+)		
79	41	276	79	0,29	14129_s_at	At3g47290	Phosphodiesterase	P	23 (+)		
100	73	323	32	0,31	14781_at	At2g22850	AtbZIP6	Tk	454 (+)		
67	34	228	77	0,29	19726_s_at	At4g11120	Elongationsfaktor	Tk	35 (-)		

Im Folgenden wurden die Promotoren aller in der *bZIP6-1*-Mutante reprimierten Gene auf mögliche konservierte Bereiche, sogenannte Promotorelemente, und bZIP-transkriptionsfaktorspezifische G-Box-Domänen (Siberil *et al.*, 2001) hin untersucht. Durch die Identifizierung gemeinsamer Promotorelemente lassen sich Rückschlüsse auf eine gemeinsame Regulation ziehen. Andererseits könnten in den untersuchten Genen vorhandene G-Box-Domänen auf eine unmittelbare Regulation durch den *bZIP6*-Transkriptionsfaktor hindeuten.
Dazu wurde ein Bereich von 500 bp stromaufwärts des Startkodons zur Analyse mittels der MEME- und MAST-Algorithmen (Bailey und Elkan, 1994; Bailey und Gribskov, 1998); http://meme.sdsc.edu) herangezogen. Insgesamt konnten sechs konservierte Motive identifiziert werden (siehe Tab. 3-8). Die genauen Positionen der einzelnen Motive sind für alle Gene in Tab. 3-6 und 3-7 angegeben. Nur für das Promotorelement 4 konnte eine statistische Relevanz gezeigt werden. Dieses Promotorelement war sprossspezifisch und in 31 der 32 untersuchten Gene vorhanden (Tab. 3-8).
Der Vergleich aller identifizierter Promotorelemente mit der PlantCARE-Datenbank (Lescot *et al.*, 2002) ergab keine Übereinstimmungen zu bereits identifizierten Promotorelementen.

Tab. 3-8: Promotoranalyse möglicher Zielgene von AtbZIP6
Die Analyse der Promotoren der aus den Mikroarray-Experimenten erhaltenen, reprimierten Gene erfolgte computergestützt mittels MEME- und MAST-Algorithmen. Dargestellt sind die Längen der einzelnen Motive, welchem Experiment die Elemente zugeordnet werden können, die Anzahl der Promotoren, in denen die Elemente vertreten sind und der e-Wert und die gemeinsame Sequenz. Der E-Wert ist ein Maß für die statistische Signifikanz. Je geringer der Wert, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten dieses Motivs in einer identischen Anzahl zufälliger Sequenzen gleicher Länge.

Motiv	Länge [bp]	Datenset	e-Wert	Anzahl	Gemeinsame Sequenz
1	20	Wurzel	7,2	16	A-[AT]-[CT]-[AC]-A-[GA]-[TC]-[AC]-A-[AC]-[GA]-[AC]-[AC]-A-A-G-A-A-A-A
2	11	Wurzel	2,5e+001	14	[GAT]-[GT]-G-[TG]-[GA]-T-[TG]-[GT]-G-T-G
3	27	Wurzel	2,7e+003	4	[CG]-C-C-[TA]-[CT]-[TA]-[CT]-[AG]-[AT]-[TA]-[CG]-T-[TC]-[CG]-[CG]-[CT]-[CT]-[GC]-[AT]-[CA]-G-[GT]-G-[GAT]-[AC]-[AG]-A
4	21	Spross	4,5e-019	31	[TC]-T-[TA]-[TC]-T-T-[TC]-[TG]-[CT]-T-[TCG]-T-[TGC]-T-[CT]-T-[TC]-[TC]-[CT]-[CGT]
5	15	Spross	2,3e+002	14	[GT]-[AG]-A-G-A-[GA]-A-[GA]-G-[AT]-G-A-[AG]-A-[GAC]
6	14	Spross	6,8e+003	5	[CG]-A-[CG]-[AGC]-[GC]-A-G-[GT]-C-[CG]-A-[CGA]-[AC]-[GC]

3.2.6 Herstellung verschiedener Konstrukte zur Komplementation der *bZIP6-1*-Mutante sowie zur Überexpression des *bZIP6*-Transkriptionsfaktors in *A. thaliana*

Das Konstrukt zur Komplementation der *bZIP6-1*-Mutante bestand aus einem 2,4 kb langen Fragment, das neben dem Promotor auch den Terminator des *bZIP6*-Gens enthielt und in den pBC302-Vektor *Hin*dIII kloniert wurde.
Zur Überexpression sollten verschiedene Versionen des *AtbZIP6* eingesetzt werden. Neben der Auswirkung eines vermehrten *bZIP6*-Transkriptes auf die pflanzliche Schwermetallantwort sollte ein möglicher Einfluss der drei C-terminalen Histidylreste auf die Schwermetallregulation des

Transkriptionsfaktors untersucht werden. Dazu wurde das gesamte *AtbZIP6*-Gen als auch die um die C-terminalen Histidylreste verkürzte Version des *AtbZIP6*-Gens mittels PCR und gleichzeitiger Einführung der Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Bam*HI in den Vektor pRT100 kloniert. Die erhaltene Expressionskassette bestand aus dem 35S-Promotor, dem entsprechenden *AtbZIP6*-Fragment und dem nos-Terminator. Anschließend wurde diese Expressionskassette *Hin*dIII in den binären Vektor pBC302 kloniert. Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens*. Es konnten unabhängige Transformanten isoliert werden.

3.3 Weiterführende Untersuchungen zur *AtPP2C* (At2g30020)

Die Sequenz von At2g30020 kodiert für eine 396 AS große Proteinphosphatase 2C. Anhand von Hydropathieanalysen (Kyte und Dolittle, 1982) wurde eine Transmembrandomäne zwischen AS 105 und 124 vorhergesagt. Außerdem konnte mit Hilfe des PSORT-Programms (Nakai und Horton, 1999; http://psort.nibb.ac.jp) ein N-terminal gelegenes, nicht zu prozessierendes Signalpeptid für den Transport in das ER identifiziert werden. Über PROSITE (Falquet *et al*., 2002) konnte eine serinreiche Region, fünf N-Myristoylierungssignale und eine Proteinphosphatase 2C-Domäne lokalisiert werden (Abb. 3-15).

Anhand dieser Analyse wurde At2g30020 in die Klasse 2 der Serin- und Threoninproteinphosphatasen, die Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} als Kofaktor verwenden, eingeteilt (Kerk *et al*., 2002).

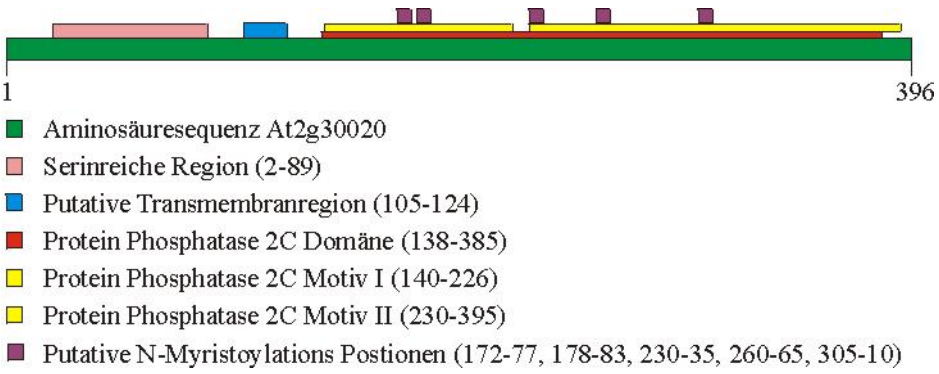


Abb. 3-15: Computeranalyse der PP2C
Schematisch dargestellt ist die abgeleitete Aminosäuresequenz der von At2g30020, sowie alle identifizierten Sequenzmotive.

3.3.1 Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten der *PP2C*

Um eine mögliche Funktion der PP2C in der Schwermetallantwort untersuchen zu können, wurde nach T-DNA-Insertionslinien im genomischen Bereich 500 bp stromauf - und stromabwärts der *PP2C* (At2g30020) sowohl in der Alpha- als auch der Basta-Population gesucht. Das „Screening“ erfolgte wie in Kap. 3.2.1. beschrieben.

Für die Alpha-Population konnten zehn und für die Basta-Population neun mögliche Insertionen identifiziert werden. Die genaue Lokalisierung der Insertionsstellen erfolgte durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte (Tab. 3-9).

Tab. 3-9: Insertionen in der genomischen Region von At2g30200

Angegeben sind die Nummern der „Superpools" und der verwendete genspezifische Primer für die PP2C, At2g30200 (RB: 500 bp 3' des Stopkodons, LB: 500 bp 5' des Startkodons). Die Position der Insertion bezieht sich auf die Position im *A. thaliana* BAC-Klon F23F1. At2g30200 ist positioniert von 60.876 bp – 62.343 bp. Grau unterlegt sind die Insertionen, die dem kodierenden Bereich am nächsten sind. Linien, für die keine Sequenzdaten erhalten werden konnten, sind mit n. d. gekennzeichnet.

Alpha-Population „Superpool"-Nummer	Insertion	Basta-Population „Superpool"-Nummer	Insertion
RB # 1	60.057 bp	RB # 6	60.563 bp
RB # 3	60.610 bp	RB # 7	60.633 bp
RB # 14	59.692 bp	RB # 11	60.795 bp
RB # 21	n. d.	RB # 12	n. d.
RB # 22	57.671 bp	RB # 15	n. d.
RB # 25	59.439 bp	RB # 36	57.616 bp
RB # 26	60.714 bp	RB # 38	60.334 bp
RB # 28	60.795 bp	LB # 10	n. d.
RB # 30	58.625 bp	LB # 13	n. d.

Die Sequenzanalyse der PCR-Produkte ergab, dass nur in einem Bereich von 81 bp vor dem Startkodon sowohl in der Basta- als auch in der Alpha-Population jeweils eine T-DNA-Insertion tragende Linie identifiziert wurde (Tab. 3-9). Da durch diese Insertionen mögliche schwermetallregulatorische Promotorelemente betroffen sein konnten, wurden aus der Alpha-Population sechs Einzelpflanzen isoliert. Auf die weitere Verwendung der Basta-Population wurde verzichtet, da durch das Aktivierungs-Tag unerwünschte Nebeneffekte auftreten konnten (Weigel *et al*., 2000).

Flotierte Blätter der erhaltenen Einzelpflanzen wurden mit 250 µM Cu^{2+} behandelt und Gesamt-RNA isoliert. Anschließende RT-PCR-Analysen zeigten keine veränderte Schwermetallantwort der *PP2C* (Abb. 3-16).

Zur weiteren Charakterisierung der PP2C wurde die abgeleitete cDNA-Sequenz mittels BLAST-Algorithmus (Altschul *et al*., 1997) zum Durchmustern der TAIR-Datenbank (Huala, *et al*., 2001), die zu diesem Zeitpunkt aus 58.408 T-DNA-flankierenden genomischen Sequenzen aus *A. thaliana* bestand, eingesetzt. Dabei wurde eine T-DNA-Insertion im kodierenden Bereich der *PP2C* identifiziert (SALK 065126). Die Analyse dieser Linie war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

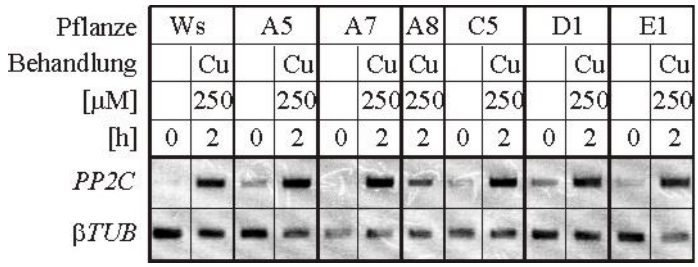


Abb. 3-16: RT-PCR-Analyse von Einzelpflanzen aus „Superpool“ 28 der Alpha-Population
Flotierte Blätter von Insertionspflanzen (A5, A7, A8, C5, D1 und E1) im Bereich des Promotors von At2g30200 wurden für 2 h mit 250 µM Cu^{2+} behandelt, Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Wildtyp-Pflanzen (WS). Die Kontrolle der Effizienz der reversen Transkription erfolgte mit β-Tubulin. Primersequenzen und PCR-Bedingungen sind in Anhang A aufgelistet.

3.3.2 Expressionsanalysen phylogenetisch verwandter PP2C

Im Genom von *A. thaliana* konnten insgesamt 69 Sequenzen identifiziert werden, die für putative PP2C kodieren (Kerk *et al*., 2002). Mit Hilfe des Programms PHYLIP (Felsenstein, 1993) wurden 33 putative PP2C einschließlich der in dieser Arbeit bereits untersuchten PP2C aus *A. thaliana* phylogenetisch analysiert. Dabei wurde angenommen, dass ein hoher Verwandtschaftsgrad innerhalb einer phylogenetischen Gruppe eine ähnliche Regulation nahe legt.

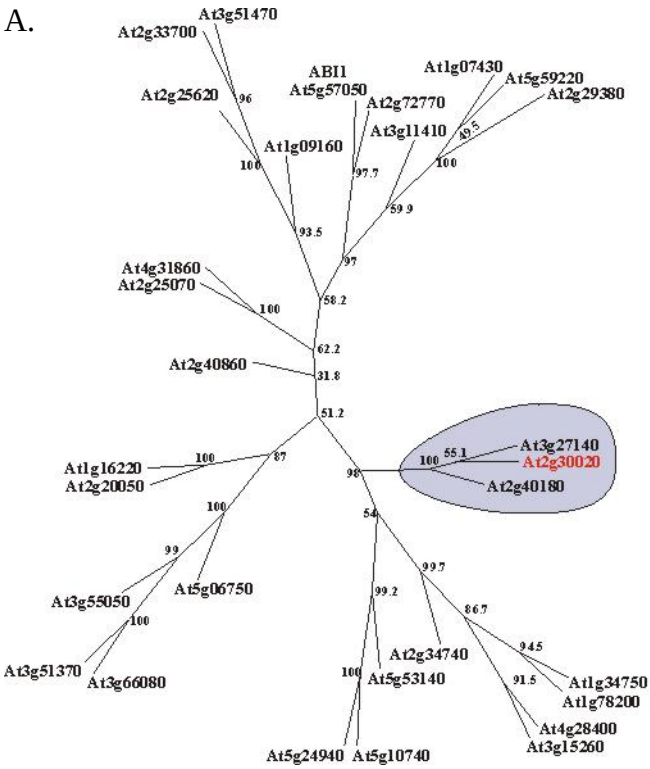
Wie bei Kerk *et al*. (2002) beschrieben, bildeten die Proteinphosphatasen 2C At2g30020, At2g40180 und At3g27140 eine phylogenetische Gruppe (Abb. 3-17 A).

Um eine mögliche gemeinsame schwermetallspezifische Regulation dieser drei PP2C zu überprüfen, wurde schwermetallbehandeltes Wurzelgewebe mittels RT-PCR analysiert.

Für At2g40180 konnte ebenfalls eine Schwermetallregulation beobachtet werden. Im Gegensatz zur starken Transkriptakkumulation von At2g30020 nach Behandlung mit 10 µM Cu^{2+} konnte für das Transkript von At2g40180 nur eine schwache Induktion durch Behandlung mit den verwendeten Schwermetallkonzentrationen gezeigt werden (Abb. 3-17 B).

Nach Behandlung mit 10 µM Cd^{2+}, 50 µM Zn^{2+} bzw. 10 µM Cu^{2+} konnte kein Transkript von At3g27140 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

A.



B.

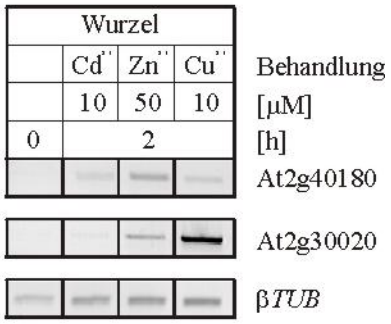


Abb. 3-17:Phylogenetische Untersuchungen der PP2C-Familie in *A. thaliana*

A.: Die phylogenetische Analyse von 33 der 69 annotierten PP2C erfolgte mit Hilfe des Phylip-Programmpaketes (Felsenstein, 1993). Die Zahlen an den einzelnen Ästen sind ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass diese Verzweigung immer an der selben Stelle auftritt. B.: Gesamt-RNA wurde aus Wurzeln in hydroponischer Kultur angezogener *A. thaliana*-Pflanzen isoliert. Die Pflanzen wurden für 2 h mit 10 µM Cd^{2+}, 10 µM Cu^{2+} oder 50 µM Zn^{2+} behandelt. 1 µg Gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die PCR-Bedingungen und die Sequenzen der genspezifischen Primer sind in Anhang A aufgelistet (n=2).

3.4 Untersuchungen zur posttranslationalen Aktivierung von MAP-Kinasen in *A. halleri* und *A. thaliana* nach Schwermetallbehandlung

Nachdem eine schwermetallspezifische, transkriptionelle Aktivierung von *AtMPK11* gezeigt (Kap. 3.1.3) und auch die Aktivierung von MAP-Kinasen für weitere abiotische Stressfaktoren wie oxidativen Stress, hyperosmotischen Stress, Kälte oder Trockenheit beschrieben werden konnte (Jonak *et al*., 2002), wurde eine mögliche posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle untersucht.

3.4.1 Vergleichende Untersuchungen zur MAPK-Aktivierung in *A. halleri* und *A. thaliana*

Zunächst wurde die Aktivierung von MAP-Kinasen in *A. halleri* und *A. thaliana* mittels Western-Analyse untersucht. Dazu wurden hydroponisch angezogene *A. halleri*- und *A. thaliana*-Pflanzen mit einem Schwermetallgemisch bestehend aus 125 µM Cu^{2+} sowie 50 µM Cd^{2+} behandelt. Die Auswahl der Konzentrationen basierte auf den im cDNA-AFLP eingesetzten Konzentrationen. Zusätzlich wurden auch die niedrigeren Ca^{2+}-Konzentrationen im verwendeten Medium berücksichtigt. Aus dem Wurzelgewebe isolierte Proteine wurden anschließend mittels Western-

Blot analysiert. Der Nachweis aktivierter MAP-Kinasen erfolgte mit einem anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper, der spezifisch für das phosphorylierte $T^{p}EY^{p}$-Motiv in der Aktivierungsschleife von MAP-Kinasen war (Samuel und Ellis, 2002).
Bereits 20 min nach der Behandlung mit dem Schwermetallgemisch konnte eine maximale Aktivierung von zwei MAP-Kinasen mit einer molekularen Masse im Bereich von 47 kDa bzw. 43 kDa in beiden *Arabidopsis*-Spezies über den Behandlungszeitraum beobachtet werden.
Da die MAPK-Aktivierungsmuster für *A. thaliana* und *A. halleri* vergleichbar waren und *A. thaliana* als Modellsystem besser etabliert ist, wurden die weiteren Untersuchungen in *A. thaliana* durchgeführt.

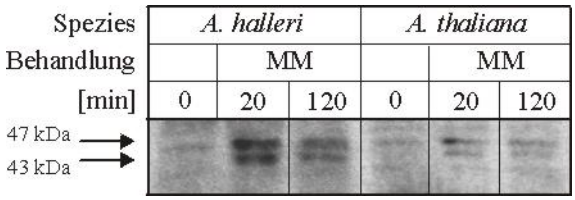


Abb. 3-18: Aktivierung von MAP-Kinasen in *A. halleri* und *A. thaliana*
Hydroponische Kulturen von *A. halleri* und *A. thaliana* wurden mit einem Gemisch aus 125 µM Cu^{2+} und 50 µM Cd^{2+} (MM) für 20 min bzw. 120 min behandelt. Die Analyse des Wurzelgewebes erfolgte mittels Immunodetektion mit dem anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper als primärem Antikörper . Für die Analyse wurden 40 µg Gesamtprotein eingesetzt.

3.4.2 Untersuchungen zur gewebespezifischen Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle

Zur Analyse der posttranslationalen Aktivierung von MAP-Kinasen wurden zwei Standardmethoden verwendet. So ist es möglich, aktivierte MAP-Kinasen indirekt mittels *in-Gel*-Kinasenachweis (Kap. 2.16) über die Phosphorylierung des Substrates MBP nachzuweisen. Daneben können mit Hilfe des anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)-Antikörpers, (Samuel und Ellis, 2002), aktivierte MAP-Kinasen immunodetektiert werden.
Für den Vergleich der beiden Methoden wurden hydroponische Kulturen von *A. thaliana* mit 125 µM Cu^{2+} für 5 min, 20 min und 120 min behandelt und Proteine aus dem Wurzelgewebe isoliert.
Mit Hilfe des *in-Gel*-Kinasenachweises konnte für Cu^{2+} die Phosphorylierung von MBP im molekularen Bereich von 47 kDa bereits nach 5 min beobachtet werden, die nach 20 min maximal war. Zusätzlich konnte eine zweite Bande im molekularen Massenbereich von 43 kDa nach einer Behandlungsdauer von 20 min detektiert werden.
Die immunologische Analyse der Western-Blots zeigt eine Aktivierung von zwei MAP-Kinasen mit molekularen Massen im Bereich von 47 kDa bzw. 43 kDa nach 20 min (Abb. 3-19).
Der Vergleich beider Methoden zeigt, dass die Immunodetektionsmethode dem *in Gel*-Kinasenachweis im technischen und zeitlichen Aufwand sowie in der Darstellung der Ergebnisse vorzuziehen ist. Deshalb wurden alle weiteren Analysen mit Hilfe von Western-Blots durchgeführt.

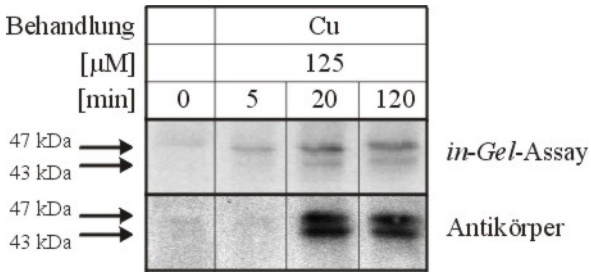


Abb. 3-19: Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Detektion aktivierter MAP-Kinasen
In hydroponischen Kulturen angezogene *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit 125 µM Cu^{2+} behandelt und nach 5, 20 und 120 min hinsichtlich aktivierter MAP-Kinasen untersucht. Die Untersuchung erfolgte mittels *in-Gel*-Kinaseassay bzw. Western-Blot-Analyse mit anschließender Immunodetektion durch den anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper. Für die einzelnen Experimente wurden jeweils 40 µg Gesamtproteinextrakt eingesetzt.

Um die Gewebespezifität der MAPK-Aktivierung zu untersuchen, wurden hydroponische *A. thaliana*-Kulturen für 2 h mit 50 µM Cd^{2+} bzw. 125 µM Cu^{2+} behandelt und anschließend aus dem Spross- bzw. dem Wurzelgewebe Proteine isoliert und mittels Western-Blot analysiert. Der Nachweis der aktivierten MAP-Kinasen erfolgte mittels Immunodetektion unter Verwendung des anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)-Antikörpers(Kap. 2.15.2).
Wie bereits beobachtet, konnte die Aktivierung von zwei MAP-Kinasen im molekularen Massenbereich von 47 kDa bzw. 43 kDa in Wurzelgewebe detektiert werden. Dabei wurde durch Cu^{2+} eine stärkere Aktivierung der MAP-Kinasen beobachtet als durch Cd^{2+}.
Im Sprossgewebe war nur Cu^{2+} in der Lage, MAP-Kinasen mit einer molekularen Masse im Bereich von 47 bzw. 43 kDa zu aktivieren. In Cd^{2+}-behandeltem Sprossgewebe konnte mit dieser Methode keine Aktivierung von MAP-Kinasen beobachtet werden (Abb. 3-20).

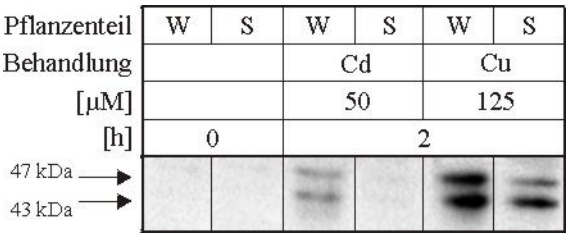


Abb. 3-20: Gewebespezifisches MAPK-Aktivierungsmuster nach Schwermetallbehandlung
Die Analyse von Spross- (S) und Wurzelgewebe (W) Cd^{2+}- und Cu^{2+}-behandelter *A. thaliana*-Pflanzen, die hydroponisch angezogen wurden, erfolgte mittels Western-Blot-Analyse und anschließender Immunodetektion durch den anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper. Die jeweilige Schwermetallapplikation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h. Zu keinem Zeitpunkt hatte der Spross direkten Kontakt zu den Schwermetallen. Pro Spur wurde 40 µg Gesamtprotein aufgetragen.

3.4.3 Untersuchung zur Abhängigkeit der MAPK-Aktivierung von der Konzentration der Cu-Ionen

Die Untersuchung der MAPK-Aktivierung in Abhängigkeit von der extrazellulär angebotenen Cu^{2+}-Konzentrationen sollte Aufschluss über die Sensitivität dieser Aktivierung geben.

Zu diesem Zweck wurden flotierte Blätter mit unterschiedlichen Cu^{2+}-Konzentrationen (1, 5, 10, 25, 50 und 100 µM) behandelt. Die Auswahl der Konzentrationen beruhte auf den Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Transkriptakkumulation von *MPK11* (Kap. 3.1.3.5). Nach erfolgter Proteinisolierung wurde die MAPK-Aktivierung mittels Western-Blots analysiert. Als Behandlungszeitraum wurden 20 min gewählt, da in den vorangegangenen Experimenten nach 20 min eine maximale Aktivierung der MAP-Kinasen zu beobachten war. Ein Vorteil flotierter Blätter ist, dass sie einfach in der Handhabung sind und das Medium praktisch keine Ionen enthält (Kap. 2.2.4), die mit den Schwermetallen um die Aufnahme konkurrieren könnten.

Auch in diesem System konnte die Aktivierung von zwei MAP-Kinasen durch Cu^{2+} mit einer molekularen Masse im Bereich von 47 kDa bzw. 43 kDa beobachtet werden. Eine Aktivierung beider MAP-Kinasen konnte bereits ab Cu^{2+}-Konzentrationen von 5 µM nachgewiesen werden.

Da die Behandlung mit 5 mM H_2O_2 keinen Einfluss auf die Aktivierung vom MAP-Kinasen zeigte, kann ein sekundärer durch H_2O_2 ausgelöster Effekt ausgeschlossen werden (Abb. 3-21).

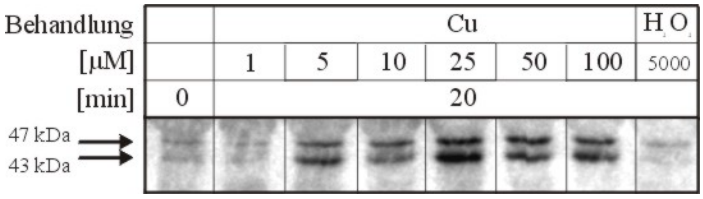


Abb. 3-21: MAPK-Aktivierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Cu^{2+}-Konzentration

Flotierte Blätter wurden für 20 min mit unterschiedlichen Cu^{2+}-Konzentrationen (1, 5, 10, 25, 50 und 100 µM), sowie 5 mM H_2O_2 behandelt. Die isolierten Proteine wurden mittels Western-Blot und anschließender Immunodetektion durch den anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper analysiert. Pro Spur wurde 40 µg Gesamtprotein aufgetragen.#

3.5 Identifizierung der durch Schwermetalle posttranslational aktivierten MAP-Kinasen in *A. thaliana*

Da es durch den verwendeten anti-Phospho-p44/42 MAP-Kinase (Thr202/Tyr204)-Antikörper nicht möglich war, spezifisch einzelne MAP-Kinasen nachzuweisen, sollten mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen bekannte MAP-Kinasen bzw. mit Hilfe von MAPK-Knockout-Mutanten einzelne, durch Schwermetalle aktivierte MAP-Kinasen identifiziert werden.

3.5.1 Immunopräzipitation von AtMPK6

Für Immunopräzipitationsexperimente von AtMPK6 wurden spezifische anti-MPK6-Antikörper genutzt (Ichimura *et al*., 2000), die von Dr. Kazuo Shinozaki (Biology Laboratory, RIKEN, Japan) zur Verfügung gestellt wurden. Dazu wurden zwei Wochen alte, in Flüssigkultur angezogene *A. thaliana*-Keimlinge mit 250 µM Cu^{2+}, 50 µM Cd^{2+} und 250 µM Zn^{2+} behandelt. Die extrahierten Proteine wurden mit dem anti-MPK6-Antikörper immunopräzipitiert (Kap. 2.17) und anschließend die Aktivität von AtMPK6 mit dem MBP-Phosphorylierungsassay bestimmt (Kap. 2.17.1). Für die Anzucht und die Schwermetallbehandlung wurde MS-Medium verwendet (Kap. 2.1.2). Aus diesem Grund wurden auch erhöhte Cu^{2+}-Konzentration eingesetzt, da nicht auszuschließen war, dass die Schwermetalle um die Aufnahme mit den erhöhten Ca-Ionenkonzentrationen im Medium konkurrieren müssen.

Die Auswertung der Autoradiografie zeigte, dass AtMPK6 durch Cu^{2+} stark aktiviert wurde. Dagegen wird die AtMPK6 durch Cd^{2+} und Zn^{2+} nur schwache aktiviert (Abb. 3-23).

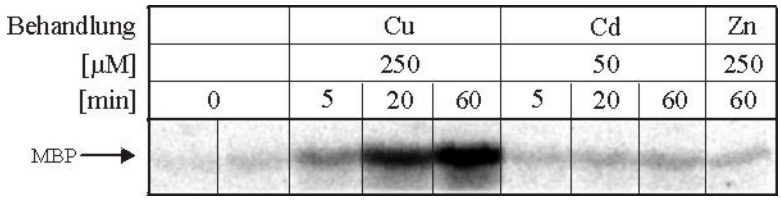


Abb. 3-23: Aktivitätsnachweis von AtMPK6

Der Nachweis der Aktivität von AtMPK6 erfolgte mittels Immunopräzipitation (Ip). Dazu wurden in Flüssigkultur angezogene Keimlinge von *A. thaliana* mit unterschiedlichen Schwermetallen behandelt (250 µM Cu^{2+}, 50 µM Cd^{2+}, 250 µM Zn^{2+}) und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Für die Immunopräzipitation wurden 100 µg Protein eingesetzt.

3.5.2 Indirekter Aktivitätsnachweis von AtMPK4 mit Hilfe der *mpk4*-Mutante

Eine mögliche Aktivierung von AtMPK4 durch Cu^{2+} wurde mit Hilfe der *mpk4*-Mutante (Petersen *et al*., 2000), die von Prof. John Mundy (Universität Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde, indirekt überprüft. Falls es sich bei der aktivierten 43 kDa-MAPK um AtMPK4 handelt, sollte in der *mpk4*-Mutante nur noch eine aktivierte MAP-Kinase mit einer molekularen Masse im Bereich von 47 kDa zu detektieren sein.

Dazu wurden flotierte Blätter der Mutante für 20 min 250 µM Cu^{2+} behandelt und mittels Western-Blot untersucht.

Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden durch die Behandlung mit Cu^{2+} in der *mpk4*-Mutante zwei aktivierte MAP-Kinasen mit den molekularen Massen im Bereich von 43 kDa und 47 kDa detektiert. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Cu^{2+}-aktivierten 43 kDa MAP-Kinase um AtMPK4 handelt (Abb. 3-24).

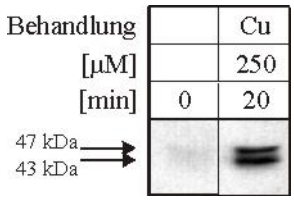


Abb. 3-24: MAP-Kinase-Aktivierung in *mpk4*-Pflanzen

Flotierte Blätter von *mpk4* wurden für 20 min mit 250 µM Cu^{2+} behandelt und anschließend mittels Western-Blot und Immunodetektion auf MAPK-Aktivität hin untersucht. Es wurde 40 µg Protein pro Spur aufgetragen.

4 Diskussion

Mit Hilfe von Mikroarray-Experimenten konnte in *A. thaliana* für eine Reihe abiotischer Stressfaktoren die Aktivierung verschiedener Gruppen von Genen gezeigt werden. So erfolgt durch Trockenstress, Kälte und osmotischen Stress die transkriptionelle Aktivierung vieler Gene, die für Signaltransduktionskomponenten und Transkriptionsfaktoren kodieren (Kreps *et al*., 2002). Die Untersuchung der Verwundungsantwort mittels Mikroarrays zeigte Gemeinsamkeiten in der Aktivierung vieler Signaltransduktionskomponenten durch abiotische Stressfaktoren (Cheong *et al*., 2002). Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Untersuchungen von Chen *et al*. (2002), die eine Veränderung der Expression von über 400 Transkriptionsfaktoren als Antwort auf verschiedene Umwelteinflüsse fanden. Sie konnten für insgesamt 21 Transkriptionsfaktoren eine für abiotischen Stress spezifische transkriptionelle Aktivierung demonstrieren.
Auch durch Cd^{2+} konnte in *A. thaliana* die transkriptionelle Aktivierung einer Reihe von putativen Signaltransduktionskomponenten beobachtet werden (Suzuki *et al*., 2001). Dazu zählten neben putativen Rezeptorkinasen und Proteinkinasen auch Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich konnte für die MAPKK-Kinase AtMEKK1 ein Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Aktivierung und der Erhöhung der Cd^{2+}-Toleranz durch heterologe Expression in *S. cerevisiae* gezeigt werden.
Diese Beispiele verdeutlichen, dass es durch Stressfaktoren zur transkriptionellen Aktivierung von Genen kommt, die an der Weiterleitung des Stresssignals beteiligt sind und z. T. auch von mehreren Stressfaktoren gemeinsam genutzt werden können.
Der Annahme folgend, dass eine transkriptionelle Aktivierung von Signaltransduktions-komponenten ein Hinweis auf ihre Funktion in der schwermetallspezifischen Signaltransduktion ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene isoliert, die nach Schwermetallbehandlung im Metallophyten *Arabidopsis halleri* differenziell exprimiert wurden. Ausgewählte Gene wurden hinsichtlich ihrer schwermetallspezifischen Expression in *A. halleri* und in *A. thaliana* vergleichend untersucht. Anschließend wurde deren Rolle bzw. Funktion in der pflanzlichen Schwermetallhomöostase näher charakterisiert.

4.1 Strategien zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene

Für die Isolierung differenziell exprimierter Gene steht ein breites Methodenspektrum zur Verfügung. Dabei kann zwischen direkten und indirekten Analysen unterschieden werden. Zu den direkten Analysen gehören Methoden, in denen Gene bzw. Genfragmente sequenziert (EST-Projekte, SAGE) oder nach ihrer Größe aufgetrennt werden (DD, cDNA-AFLP).
Als indirekte Methoden bezeichnet man die Hybridisierung von Oligonukleotid-Mikroarrays (Zhu *et al*., 2001) bzw. cDNA-Mikroarrays mit gewebespezifischen oder stressspezifischen Proben (Girke *et al*., 2000; Negishi *et al*., 2002; Bovet *et al*., 2003).
Die ursprünglichen Methoden zur Identifizierung von differenziell regulierten Genen sind das „Differential Display“ (Liang und Pardee, 1992) und die „Arbitrarily Primed“ (AP) PCR (Welsh *et al*., 1992). Diese direkten Analysen beruhen auf der reversen Transkription und der Amplifikation

von cDNA-Teilpopulationen aus Gesamt-RNA bzw. PolyA$^+$-RNA mit Hilfe von Zufallsprimern und der Darstellung eines definierten Bandenmusters auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel. Mit Hilfe dieser Methoden konnte in Pflanzen eine große Anzahl differenziell regulierter Gene z. B. in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Li und Gray, 1997; Sablowski und Meyerowitz, 1998), in der Pathogenantwort (Horvath und Chua, 1996; Kistner, 1999; Kemmerling, 2001; Petters, 2001) und als Reaktion auf Umwelteinflüsse (Sharma und Davis, 1995; Kadyrzhanova *et al*., 1998) isoliert werden. Suzuki *et al*. (2001) zeigten mittels einer auf Fluoreszenzmarkierung basierenden DD-Methode in *A. thaliana* die differenzielle Regulation von 31 Genen nach Behandlung mit Cd^{2+}. Als Nachteil der DD-Methode erwies sich die Verwendung von Zufallsprimern und niedrigen Annealingtemperaturen, um eine Primerbindung an vielen Stellen zu ermöglichen. Diese Versuchsbedingungen führten zu einem hohen Anteil an falsch positiven Banden (Sun *et al*., 1994), einer bevorzugten Amplifikation von 3‘-nichttranslatierten Enden (Matz und Lukyanov, 1998) sowie zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Haag und Raman, 1994). Zudem war es nicht möglich, das Auftreten bekannter Sequenzen vorherzusagen (Debouck, 1995).
Die ebenfalls direkte Methode der Sequenzierung von sogenannten „Expressed Sequence Tags“ (EST) aus cDNA-Bibliotheken dient vor allem der Identifizierung neuer Gene und der Feststellung der relativen Transkriptabundanz zum getesteten Zeitpunkt (Ewing *et al*., 1999; White *et al*., 2000). Der Hauptnachteil von EST-Projekten besteht neben der Herstellung einer repräsentativen cDNA-Bibliothek (Carninci und Hayashizaki, 1999) in den hohen Sequenzierungskosten. Eine Verringerung der zu sequenzierenden ESTs bzw. eine Anreicherung differenziell exprimierter cDNAs kann durch eine subtraktive Hybridisierung (Gamas *et al*., 1996) oder verwandte Methoden erreicht werden (Sargent, 1987; Diatchenko *et al*., 1996). Eine Alternative zu EST-Projekten ist die Methode der „Serial Analysis of Gene Expression“ (SAGE) (Velculescu *et al*., 1995). Dabei wird gewebespezifische bzw. stressspezifische cDNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt, so dass 10-14 bp lange cDNA-Fragmente entstehen. Diese werden anschließend ligiert, kloniert und sequenziert (Velculescu *et al*., 1995). Neben ebenfalls hohen Sequenzierungskosten ist ein entscheidender Nachteil, dass eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen SAGE-Fragmente nur bei Organismen mit vollständig sequenziertem Genom erfolgen kann (Matsumura *et al*., 1999).
Um vor allem die mit der „Differential Display“ Methode verbundenen Probleme zu vermeiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die direkte Methode des „cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism“ (cDNA-AFLP) eingesetzt. Bei dieser Methode können unter stringenten PCR-Bedingungen cDNA-Teilpopulationen reproduzierbar auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Die hohe Stringenz wird durch Ligation von Adaptern an die mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen gespaltenen cDNA-Fragmente und durch die Verwendung von adapterspezifischen Primern erreicht (Vos *et al*., 1995; Bachem *et al*., 1996). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die dargestellte Bandenstärke mit der Transkriptabundanz direkt korreliert (Bachem *et al*., 1996; Qin *et al*., 2000). Wie beim DD besteht auch beim cDNA-AFLP eine ausgeschnittene Bande in der Mehrzahl der Fälle aus einem heterogenen Gemisch von cDNA-Fragmenten, so dass für die Ermittlung der Sequenz die Klonierung des Fragmentes unumgänglich ist (Baldwin *et al*., 1999).

Zusätzlich können gering abundante durch stark abundante Transkripte kompetiert und so für die Analyse nicht zugänglich gemacht werden. Die Einführung von zusätzlichen selektiven Nukleotiden ermöglicht auch die Amplifizierung von gering abundanten Transkripten (van der Biezen *et al*., 2000). Allerdings nimmt mit der Anzahl von selektiven Nukleotiden in den Primern die Reproduzierbarkeit des Bandenmusters ab (Fukuda *et al*., 1999), so dass der Einsatz von insgesamt vier selektiven Nukleotiden einen akzeptablen Kompromiss darstellt (Bachem *et al*., 1996).

Die Identifikation differenziell exprimierter Gene mittels cDNA-AFLP erfolgte bereits in Pflanzen (Bachem *et al*., 1996; Durrant *et al*., 2000; Ditt *et al*., 2001; Simones-Araujo *et al*., 2002; Dubos und Polomin, 2003; Breyne *et al*., 2003), in verschiedenen pflanzlichen Pathogenen (Qin *et al*., 2000; van der Biezen *et al*., 2000; Noel *et al*., 2001) sowie im Tumorgewebe von Ratten (Fukuda *et al*., 1999).

Eine Variante des cDNA-AFLP ist das „Restriction Fragment Differential Display“ (RFDD) (Habu *et al*., 1997), bei dem die cDNA mit nur einer häufig spaltenden Restriktionsendonuklease fragmentiert wird. Dies hat den Vorteil, dass annähernd jede transkribierte cDNA von der Restriktionsendonuklease mehrfach gespalten wird und somit für die Analyse zur Verfügung steht. Allerdings nimmt dadurch u. a. die Komplexität des Bandenmusters und die Anzahl der cDNA-Fragmente im unteren Größenbereich zu.

4.2 Identifizierung schwermetallregulierter Gene in *A. halleri* mittels cDNA-AFLP

Zunächst wurde die transkriptionelle Schwermetallantwort von *A. halleri* mit dem „displayProfile™ Kit“ (QBiogene, Heidelberg) untersucht. Das System basiert auf einer Modifikation der RFDD-Methode nach Habu *et al*. (1997). Insgesamt konnten 34 differenziell exprimierte Fragmente aufgetrennt werden. Allerdings zeigten annähernd 90 % der sequenzierten Klone Homologie zu ribosomaler RNA, nur vier Klone besaßen Homologie zu bekannten *A. thaliana*-Proteinen. Dieser hohe Anteil an Fragmenten mit einer Homologie zu ribosomaler RNA lässt sich durch die im Herstellerprotokoll empfohlenen Versuchsbedingungen erklären. Zum einen wurde die Erststrangsynthese mit Gesamt-RNA durchgeführt und zum anderen fehlten die sonst üblichen Denaturierungsschritte. Dies führte dazu, dass intramolekulare Basenpaarungen der ribosomalen RNA nicht aufgelöst wurden und somit die ribosomale RNA ein Substrat für die verwendete doppelstrangspezifische *Taq*I-Restriktionsendonuklease darstellte. Durch die Verwendung von PolyA$^+$-RNA hätte dieser große Anteil an Fragmenten ribosomalen Ursprungs vermieden werden können, wie bei Petters *et al*. (2002) für die Isolierung einer Phosphatmangel-induzierten Phosphatase aus der Kartoffel beschrieben.

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse der RFDD-Analyse wurde auf die ursprüngliche cDNA-AFLP-Methode (Vos *et al*., 1995; Bachem *et al*., 1996) zurückgegriffen. Mit Hilfe der cDNA-ALFP-Analyse schwermetallbehandelter *A. halleri*-Keimlinge wurden über einen Versuchszeitraum von 24 h nach der Verwendung von 80 der möglichen 256 Primerkombinationen aus insgesamt 2610 Banden 278 Banden mit differenziellem Expressionsmuster identifiziert. Dies entspricht 10,7

% der Gesamtbandenanzahl. Davon waren 73 % der Fragmente induziert, 19 % reprimiert und 8 % zeigten ein transientes Expressionsmuster. Dieser ermittelte Prozentsatz induzierter bzw. reprimierter Fragmente ist mit anderen cDNA-AFLP-Analysen vergleichbar (Durrant *et al*., 2000; Ditt *et al*., 2001; Simones-Araujo *et al*., 2002).
Ein vergleichbar hoher Prozentsatz differenziell exprimierter Fragmente wurde nur von Simones-Araujo *et al*. (2002) beschrieben, die sich mit der Auswirkungen von Hitzeschock auf die Genexpression in Wurzelknöllchen von *Vicia unguiculata* beschäftigten. Dagegen lag der Prozentsatz an differenziell exprimierten Fragmenten in weiteren pflanzlichen cDNA-AFLP-Analysen, die sich mit Pflanze-Pathogen-Interaktionen beschäftigten, um fast 90 % niedriger (Qin *et al*., 2000; Durrant *et al*., 2000; Ditt *et al*., 2001).

4.2.1 Reproduzierbarkeit und Intensitätsunterschiede im cDNA-AFLP-Bandenmuster

Um die Reproduzierbarkeit der cDNA-AFLP-Methode zu untersuchen, wurde das Bandenmuster dreier unabhängiger Experimente miteinander verglichen. Wie bereits bei Durrant *et al*. (2000) und Ditt *et al*. (2001) beschrieben, konnte in diesen Versuchen die hohe Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt werden.
Allerdings wurden zwischen den einzelnen Experimenten Intensitätsunterschiede im Bandenmuster beobachtet. Diese Intensitätsunterschiede hatten aber keinen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Bandenmusters. Neben den Intensitätsunterschieden im Gesamtbandenmuster wurden auch Intensitätsunterschiede zwischen einzelnen Banden der unabhängigen Experimente gefunden, während die übrigen Banden von gleicher Intensität waren. Dieses Phänomen wurde auch von Durrant *et al*. (2000) beobachtet. Um Schwankungen in der biologischen Varianz zwischen den einzelnen Experimenten zu minimieren und dadurch resultierende Intensitätsunterschiede auszugleichen, wurde für die weitere Analyse ein Gemisch, bestehend aus Aliquots der drei unabhängigen Experimente, erfolgreich verwendet.

4.2.2 Untersuchung der Schwermetalltoleranz bzw. –hyperakkumulation mittels cDNA-AFLP

Ein ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war mit Hilfe der cDNA-AFLP-Analyse Gene zu identifizieren, die für die Ausprägung der Schwermetalltoleranz in *A. halleri* verantwortlich sind. Als Kriterien zur Identifikation wurde angenommen, dass solche Gene nur in *A. halleri* vorkommen bzw. nur durch Schwermetalle in *A. halleri* transkriptionell aktiviert werden.
Mit Hilfe der BLAST-Datenbankanalyse konnte für 186 der 191 (97,4 %) aus dem cDNA-AFLP stammenden Klone eine homologe Sequenz in *A. thaliana* identifiziert werden. Für fünf Klone (2,6 %) konnte keine Homologie zu pflanzlichen Sequenzen gefunden werden. Dies kann auf Verunreinigungen während einzelner Syntheseschritte zurückgeführt werden. Zusätzlich konnten für keinen der mittels RT-PCR- bzw. Makroarray-Analyse untersuchten Klone starke Unterschiede im Expressionsmuster zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* beobachtet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind ein Hinweis, dass sich Schwermetalltoleranzgene nicht durch cDNA-AFLP-Analysen oder verwandte Methoden identifizieren lassen. Zusätzlich wurde durch die Arbeiten von

Macnair *et al*. (1999) und Bert *et al*. (2002; 2003) gezeigt, dass sowohl die Zn^{2+}-Hypertoleranz und –Hyperakkumulation als auch die Cd^{2+}-Hypertoleranz und –Hyperakkumulation jeweils konstitutiv ausgeprägte Merkmale in *A. halleri* sind. Allerdings waren weder Macnair *et al*. (1999) noch Bert *et al*. (2002; 2003) in der Lage, durch Kreuzungsexperimente zwischen *A. halleri* und der nicht-toleranten Art *A. lyrata* Gene zu identifizieren, die für die Ausprägung der Schwermetalltoleranz bzw. -hyperakkumulation verantwortlich sind.

Durch den Vergleich schwermetalltoleranter und nicht-schwermetalltoleranter Ökotypen einer Art gelang es, einzelne Gene, die möglicherweise an der Ausprägung dieses Merkmals beteiligt sind, zu identifizieren. So konnte für den Zn^{2+}-Hyperakkumulator *Thlaspi caerulescens* im Vergleich zu der nicht-hyperakkumulierenden Art *T. arvense* eine konstitutiv höhere Expression des Zn-Transporters *ZNT1* gezeigt werden (Lasat *et al*., 1999; Pence *et al*., 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden für weitere Zn^{2+}-Transporter in Vergleichen zwischen *T. caerulescens* und *T. arvense* erhalten (Assuncao *et al*., 2001). Daneben zeigte der Vergleich der Cu-hypertoleranten *Silene vulgaris* mit Cu-toleranten *Silene*-Arten, dass für die Ausprägung der Hypertoleranz gegenüber Kupfer u. a. eine konstitutiv erhöhte Expression sowie eine erhöhte Kopienanzahl des Metallothionein-Gens *SvMT2b* im Genom mit verantwortlich sind (van Hoof *et al*., 2001).

Da artspezifische Unterschiede in der Schwermetalltoleranz u. a. auf eine veränderte Genexpression zurückzuführen sind, ist es mit Hilfe von vergleichenden Mikroarray-Analysen möglich, diese speziesspezifischen Unterschiede im Expressionsmuster nachzuweisen und daraus Schlüsse über mögliche Toleranzmechanismen zu ziehen.

Enard *et al*. (2002) demonstrierten mit dieser Methode, dass der Vergleich der Transkriptome nahe verwandter Arten, wie Mensch, Schimpanse, Gorilla und Orang-Utan möglich ist.

Um solche speziesspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Merkmale der Schwermetalltoleranz bzw. –hyperakkumulation zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* zu identifizieren, konnten in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe von Affymetrix-Mikroarrays eine Reihe von Genen identifiziert werden, die in *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert und für die Zn^{2+}-Hypertoleranz mitverantwortlich sind (Weber *et al*., in Druck).

4.2.3 Sequenzhomologie zwischen *A. halleri* und *A. thaliana*

Durch den Vergleich der 190 aus dem cDNA-AFLP erhaltenen Sequenzen mit den homologen *A. thaliana*-Sequenzen konnte eine Sequenzidentität für den kodierenden Bereich zwischen beiden *Arabidopsis*-Spezies von 94,2 % ermittelt werden. Das entspricht einer Sequenzdiversität von 5,8 %. Vergleiche zwischen dem Alkoholdehydrogenase-Gen von *Arabis gemmifera* und *A. thaliana* zeigten eine Diversität von 5,5 % (Miyashita *et al*., 1996). In neueren systematischen Untersuchungen wurde *Arabis gemmifera* als *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* klassifiziert (O´Kane und Al-Shehbaz, 1997). Da diese ermittelte Diversität nur auf dem Vergleich eines Gens beruht, ist es möglich, dass sich die Diversität durch den Vergleich weiterer Gene noch verändern.

Die erhaltenen Daten stützen somit die systematische Neueinteilung von *Arabidopsis halleri* aus der Gattung *Cardaminopsis* in die Gattung *Arabidopsis*. Diese Neuklassifizierung basiert auf dem

Vergleich ribosomaler DNA (O´Kane und Al-Shehbaz, 1997). Zudem wurden *Arabidopsis lyrata*, *A. petraea* und *A. halleri* als die nächsten Verwandten von *A. thaliana* bestimmt (Koch *et al*., 1999). Dabei zeigte sich, dass *A. halleri* phylogenetisch dem pflanzlichen Modellsystem *A. thaliana* am nächsten steht, aber nicht mit diesem kreuzbar war (Koch *et al*., 1999). Neben den Vergleichen ribosomaler DNA (O´Kane und Al-Shehbaz, 1997; Koch *et al*., 1999) erfolgte die systematische Klassifizierung und Verwandtschaftsanalyse durch Sequenzvergleiche der Gene der Alkoholdehydrogenase und der Chalkonsynthase (Koch *et al*., 2000) sowie durch Promotoranalysen des Chalkonsynthase- und des Apelata3-Promotors (Koch *et al*., 2001).
Die enge verwandtschaftliche Beziehung zur nicht-schwermetalltoleranten und nicht-schwermetallhyperakkumulierenden Art *A. lyrata* verdeutlicht einen weiteren Vorteil des Metallophyten *A. halleri*. Durch Kreuzungsexperimente der interfertilen Arten *A. halleri* und *A. lyrata* könnten mit Hilfe molekularer Marker Loci, die für die Ausprägung der Schwermetalltoleranz- und Hyperakkumulationsmechanismen verantwortlich sind, identifiziert werden.

4.3 Identifizierung von ABC-Transportern in *A. halleri* und in *A.thaliana*

Wie bereits beschrieben, sind die Merkmale der Cd^{2+}- und Zn^{2+}-Hypertoleranz und -Hyperakkumulation konstitutiv ausgeprägt (Macnair, 1999; Bert *et al*., 2003). In vergleichenden Studien zwischen toleranten und hypertoleranten Arten konnte eine Beteiligung von Transportproteinen an der Ausprägung der Hypertoleranz gezeigt werden (Pence *et al*., 2000; Assuncao *et al*., 2001). Die größte Transporterfamilie in *A. thaliana* ist die Familie der ABC-Transporter (Sanchez-Fernandez *et al*., 2001). Für Mitglieder dieser Familie konnte u. a. in Pflanzen und Hefen eine Beteiligung am Transport bzw. der Sequestrierung von Cd^{2+} gezeigt werden (Tommasini *et al*., 19998; Li *et al*., 1997; Ortiz *et al*., 1992; 1995). In Pflanzen konnte bis jetzt noch kein ABC-Transporter identifiziert werden, der die Aufnahme von Cd^{2+}-Phytochelatinkomplexen in die Vakuole, einen der letzten Schritte der Cd^{2+}-Detoxifizierung, vermittelt (Vögeli-Lange *et al*., 1990; Salt und Rauser, 1995). Zusätzlich wurde angenommen, dass Cd^{2+} zu einer transkriptionellen Aktivierung von ABC-Transportern führt, die am Transport von Cd-Phyotchelatinkomplexen vermitteln. Diese Annahme beruht darauf, dass alle Gene, die für Schritte der Schwefelaufnahme, der Cystein- und Glutathionbiosynthese sowie der Phytochelatinsynthese kodieren, transkriptionell durch Cd^{2+} aktiviert werden (Heiss *et al*., 1999; Harada *et al*., 2002; Xiang und Oliver, 1998; Lee und Korban, 2002; Clemens *et al*., 1999). Um ABC-Transporter, die möglicherweise für die Hypertoleranz und/oder Hyperakkumulation in *A. halleri* verantwortlich sind, aber auch um mögliche Kandidaten für den Transport von Cd-Phytochelatinkomplexen zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit cDNA-Mikroarrays, (Bovet *et al*., 2003), mit fluoreszenzmarkierter cDNA, die aus kontroll- und Cd^{2+}-behandeltem Wurzelgewebe von *A. halleri* und *A. thaliana* isoliert wurde, hybridisiert.
Die Auswertung der Daten zeigte, dass trotz einer ermittelten Diversität von 5,8 % im kodierenden Bereich zwischen beiden *Arabidopsis*-Spezies aussagekräftige Mikroarraydaten erhalten werden

konnten. Untersuchungen über artspezifische Expressionsmuster mittels Oligonukleotid-Mikroarrays konnten Expressionsunterschiede im Gehirn vom Menschen, Schimpansen und Orang-Utan identifiziert werden (Enard *et al*., 2002). Für eine Diversität von 4,5% konnten im kodierenden Bereich aussagekräftige Daten erhalten werden (Enard *et al*., 2002).

Die Analyse der Mikroarraydaten für die Vergleiche von unbehandeltem mit Cd^{2+}-behandeltem Wurzelgewebe aus *A. halleri* bzw. *A. thaliana* konnten keine Unterschiede im Expressionsmuster von *A. halleri* detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte die gleiche Behandlung in *A. thaliana* zu einer mehr als zweifachen Induktion des ABC-Transporters *AtWBC15*. Beim Vergleich beider *Arabidopsis*-Spezies unbehandelt und nach Behandlung mit Cd^{2+} zeigte *AtWBC15* in *A. thaliana* eine vierfach erhöhte Expression.

AtWBC15 gehört zur WBC-Familie, der größten ABC-Transporter-Familie in *A. thaliana* und zeichnet sich, wie der ABC-Transporter HMT1, der den Transport von Cd^{2+}-Phytochelatinkomplexen in die Vakuole von *S. pombe* vermittelt (Ortiz *et al*., 1992; 1995), durch sechs putative Transmembrandomänen aus (Sanchez-Fernandez *et al*., 2001). Die Bezeichnung WBC beruht auf den erstmals aus *Drosophila melanogaster* isolierten ABC-Transportern „White", „Brown" und „Scarlet", die Teil eines Permeasekomplexes sind. Sie sind für den Transport der Pigmentvorstufen Guanin und Tryptophan in die Pigmentzellen der Facettenaugen verantwortlich (Dreesen *et al*., 1988). Daneben konnte für ein menschliches, homologes Gen der WBC-Familie eine Beteiligung an der Detoxifizierung von Pharmaka in Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Doyle *et al*., 1998).

Neben einer Funktion in der Detoxifizierung von Cd^{2+}-Phytochelatinkomplexen könnte AtWBC15 den Transport von Cd^{2+}-Gluthationkomplexen vermitteln. Dieser Weg der Cd^{2+}-Detoxifizierung wurde bereits für *S. cerevisiae* beschrieben und erfolgt dort durch den ABC-Transporter *ScYCF1* („**Y**east **C**admium **F**actor 1"; Li *et al*., 1997).

Zur Klärung der Beteiligung von AtWBC15 an der Detoxifizierung von Cd^{2+}-Phytochelatinkomplexen sollte zuerst die transkriptionelle Aktivierung nach der Behandlung mit Cd^{2+} durch eine unabhängige Methode bestätigt werden. Anschließend wären Untersuchungen zur Komplementation der Cd^{2+}-Phytochelatintransportdefizienten *S. pombe*-Mutante *hmt1* bzw. der *S. cerevisiae ycf1*-Mutante denkbar.

4.4 Auswahl und Charakterisierung von Kandidatengenen in *A. halleri* und *A. thaliana*

Für viele Signaltransduktionswege in Pflanzen und anderen eukaryotischen Organismen konnte die transkriptionelle Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen sowie Transkriptionsfaktoren als Antwort auf einen äußeren Stimulus nachgewiesen werden. Auch nach der Applikation von Schwermetallen konnte eine Reihe transkriptioneller Veränderungen beobachtet werden. So wurde in *A. thaliana* die transkriptionelle Aktivierung einer Reihe von putativen Signaltransduktionskomponenten wie Rezeptorkinasen, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren durch Cd^{2+} beobachtet (Suzuki *et al*., 2001). Basierend auf diesen transkriptionellen Daten konnte

für die MAPKK-Kinase AtMEKK1 und das Metallochaperon CdI19 eine Funktion in der Toleranz gegenüber Cd^{2+} demonstriert werden (Suzuki et al., 2001; 2002).
Um ein besseres Verständnis der schwermetallspezifischen Signaltransduktionswege zu erhalten, wurden aus der cDNA-AFLP-Analyse hauptsächlich Klone ausgewählt, deren Sequenz Homologie zu Genen aufwiesen, die für Signaltransduktionskomponenten bzw. Proteine der Transkriptionskontrolle kodieren. Insgesamt konnten 39 Sequenzen dieser Klasse zugeordnet werden. Mittels RT-PCR wurde die schwermetallspezifische Regulation von vier dieser cDNA-AFLP-Klone untersucht. Dabei handelte es sich um eine Proteinphosphatase 2C, eine MAP-Kinase, einen bZIP-Transkriptionsfaktor und eine Rezeptorkinase. Außer für die Rezeptorkinase konnten für die übrigen Kandidatengene die in der cDNA-AFLP-Analyse erhaltenen Expressionsmuster bestätigt werden. Daher wurden diese drei Gene hinsichtlich ihrer Rolle in der schwermetallspezifischen Signaltransduktion weiter analysiert und charakterisiert.

4.5 Charakterisierung des *bZIP6*-Transkriptionsfaktors

Sowohl die konstitutive als auch die stressspezifische Expression von Genen ist abhängig von der Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit sogenannten „cis-acting“ Elementen in den Promotoren der Gene und/oder der Interaktion mit weiteren für die Expression notwendigen Transkriptionsfaktoren (Liu *et al*., 1999).
Zu den „cis-acting“ Elementen in Pflanzen werden palindromische A-, C- und vor allem G-Boxen gezählt, an deren gemeinsame Kernsequenz 5’-ACGT-3’ bZIP-Transkriptionsfaktoren binden (Izawa *et al*., 1993). Die Spezifität der Bindung wird dabei durch Kernregion flankierende Nukleotide gewährleistet (Izawa *et al*., 1993).
Transkriptionsfaktoren werden nach der Struktur ihrer DNA-Bindedomänen eingeteilt (Jakoby *et al*., 2002). Basische Leucin-Zipper (bZIP) Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer basischen DNA-Bindedomäne und einer sogenannten Leucin-Zipperdomäne. Innerhalb der basischen DNA-Bindedomäne befinden sich außerdem ein Kernlokalisierungssignal sowie mehrere regulatorische Protein-Protein-Interaktionsstellen. Sie ist über eine kurze Scharnierregion („hinge“) mit der Leucin-Zipperdomäne verbunden. Leucin-Zipper sind durch mindestens vier Leucylreste charakterisiert, die durch jeweils sechs Aminosäuren voneinander getrennt sind. Sie sind für die Ausbildung der typischen amphipatischen α-helikalen Struktur verantwortlich (Siberil *et al*., 2001) und ermöglichen eine Homo- bzw. Heterodimerisierung der bZIP-Transkriptionsfaktoren (Strathmann *et al*., 2001).
Für pflanzliche bZIP-Transkriptionsfaktoren konnte eine Regulation während verschiedener Entwicklungsstadien gezeigt werden (Strathmann *et al*., 2001; Chuang *et al*., 1999; Oyama *et al*., 1997; Mikami *et al*., 1995). Neben der Beteiligung vieler bZIP-Proteine an einer hormongesteuerten Genexpression beispielsweise durch ABA oder Gibbereline (Kang *et al*., 2002; Sano und Nagata, 2002; Lopez-Molina und Chua, 2000; Fukazawa *et al*., 2000) konnte auch die Regulation stressspezifischer Antwortreaktionen gezeigt werden. So wurde eine Beeinflussung der Genregulation durch bZIP-Transkriptionsfaktoren durch Licht (Holm *et al*., 2002; Oyama *et al*.,

1997), Sauerstoffmangel (Devetten und Ferl, 1995), Kälte (Kim *et al*., 2001), osmotischen Stress (Kusano *et al*., 1995), oxidativen Stress (Chen *et al*., 1996; Zhang *et al*., 1993), Verwundung und Pathogenbefall (Lee *et al*., 2002; Kim und Delaney, 2002; Niggeweg *et al*., 2000; Stankovic *et al*., 2000) nachgewiesen.

4.5.1 *AtbZIP6* wird durch Schwermetalle transkriptionell aktiviert

Die Auswertung der cDNA-AFLP-Analyse für das schwermetallinduzierte Fragment 11 ergab, dass es sich beim korrespondierenden Klon um das homologe Gen zum basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor *AtbZIP6* handelt. Mittels cDNA-AFLP-Analyse konnte eine Induktion des Fragmentes durch die Behandlung mit Cu^{2+} gezeigt werden.

RT-PCR-Analysen flotierter Blätter demonstrierten die Cu^{2+}-abhängige Transkriptakkumulation von *bZIP6* in *A. thaliana* und *A. halleri*. Dagegen erfolgte in mit Cu^{2+} behandelten hydroponischen Kulturen eine wurzelspezifische Akkumulation des Transkriptes von *AtbZIP6*. Außerdem konnte in flotierten, mit Cd^{2+} behandelten Blättern eine Induktion des Transkriptes beobachtet werden, die in *A. thaliana* nach Behandlung mit 10 µM Cd^{2+} und in *A. halleri* mit 100 µM Cd^{2+} ihr Maximum erreichte.

Zusätzlich zur Induktion durch Cd^{2+} und Cu^{2+} wurde für *AtbZIP6* auch eine Induktion durch NaCl beobachtet. Wie bereits für Cu- und Cd-Ionen beschrieben, kann auch NaCl indirekt oxidativen Stress auslösen (Zhu, 2001). Dabei werden die entstandenen, überschüssigen ROS nicht mehr effizient genug abgefangen und führen über die Fenton-Reaktion zur Lipidperoxidation (Avsian-Kretchmer *et al*., 1999; Ben-Hayyim *et al*., 2001). Die beobachtete Transkriptakkumulation von *AtbZIP6* durch Salzstress konnte mit Hilfe von Affymetrix „GeneChip® Arabidopsis Genome“ Mikroarray-Analysen nicht bestätigt werden (Chen *et al*., 2002; Kreps *et al*., 2002). Ursachen für diese Unterschiede können in den experimentellen Ansätzen der Experimente und in der Auswertung der Mikroarray-Daten gefunden werden. Im Gegensatz zu den für die RT-PCR-Analysen eingesetzten flotierten *A. thaliana*-Blätter, die mit 150 mM NaCl für 2 h behandelt wurden, verwendeten sowohl Kreps *et al*. (2002) als auch Chen *et al*. (2002) neben hydroponisch angezogenen Pflanzen auch eine niedrigere Salzkonzentration (100 mM NaCl) bei 3 h Behandlungsdauer. So ist es möglich, dass bei Kreps *et al*. (2002) und Chen *et al*. (2002) die notwendige Konzentration zur Induktion der Transkriptakkumulation von *AtbZIP6* nicht überschritten wurde. Zusätzlich könnten die unterschiedlichen verwendeten Anzuchtsysteme und die Art und Weise der Stressbehandlung diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Dagegen führte die Behandlung mit H_2O_2 in Übereinstimmung mit Kreps *et al*. (2002) und Chen *et al*. (2002) zu keiner Akkumulation des *AtbZIP6*-Transkripts.

Neben dem Transkriptionsfaktor *GmHSF34* aus der Sojabohne ist *AtbZIP6* der bis dahin einzige durch Cd^{2+} und Cu^{2+} induzierte Transkriptionsfaktor aus Pflanzen.

Bei *GmHSF34* handelt es sich um einen „heat-shock“-Transkriptionsfaktor (HSF), dessen Aktivierung durch Hitzebehandlung und durch Behandlung mit Cd^{2+} erfolgt (Nover *et al*., 2001; Czarneckaverner *et al*., 1995). Da ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von

Hitzeschockproteinen (HSP) und induzierter Schwermetalltoleranz in Pflanzen bereits bekannt ist (Wollgiehn und Neumann, 1995; Neumann *et al*., 1994), kann für *AtbZIP6* eine transkriptionelle Aktivierung durch Hitzebehandlung nicht ausgeschlossen werden.

4.5.2 Phänotypische Charakterisierung der *bZIP6-1*-Mutante

Um eine mögliche Beteiligung von AtbZIP6 an der Schwermetallhomöostase zu untersuchen, wurde eine homozygote T-DNA-Insertionsmutante (*bZIP6-1*) isoliert. Da bereits mit Hilfe von Wurzelwachstumsexperimenten schwermetallbedingte Phänotypen in Mutanten bzw. Überexpressionslinien beobachtet werden konnten (Howden *et al*., 1995; Thomine *et al*., 2000), wurde die *bZIP6-1*-Mutante zunächst mit verschiedenen Cu^{2+}-Konzentrationen im Medium behandelt und auf eine Änderung des Wurzelwachstums hin untersucht. Dabei gelang es nicht eindeutig, den Einfluss von Cu^{2+} auf das Wurzelwachstum zu zeigen. Dagegen konnte ab Cu^{2+}-Konzentrationen von 25 µM in der *bZIP6-1*-Mutante ein um mindestens den Faktor zwei verringerter Chlorophyllgehalt gemessen werden. Außerdem konnte eine Verschiebung des Verhältnisses von reduziertem zu oxidiertem Glutathion zu Gunsten von oxidiertem Glutathion in Cu^{2+}-behandeltem Sprossgewebe in der *bZIP6-1*-Mutante gezeigt werden (Dr. Emiko Harada, IPB Halle, persönliche Mitteilung).

Diese Beobachtungen könnten durch eine Beteiligung von AtbZIP6 an der Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxstatus nach Kupferstress erklärt werden. Dabei würde es in der *bZIP6-1*-Mutante zu Veränderungen des intrazellulären Redoxstatus kommen.

Das am besten dokumentierte Beispiel für die Zerstörung der Glutathion-Homöostase in Pflanzen sind katalasedefiziente CAT-Mutanten aus Gerste, die das photorespiratorisch anfallende H_2O_2 über den Glutathion-Ascorbat-Zyklus entgiften müssen. Neben einer nachhaltigen Oxidation von GSH nimmt auch die Gesamtmenge an Glutathion zu (Noctor *et al*., 2002). Dagegen konnte in CAT-defizientem Tabak nur die Zunahme von reduziertem Glutathion beobachtet werden (Willekens *et al*., 1997).

Aufgrund vergleichbarer Veränderungen im Redoxstatus der Katalase-defizienten CAT- Mutanten und der *bZIP6-1*-Mutante, wurde die Expression des Katalase-Gens *AtCAT3* (At1g20620) untersucht. Es konnte sowohl für die *bZIP6-1*-Mutante als auch für den Wildtyp eine konstitutive Expression des *AtCAT3*-Transkriptes gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach ist die Veränderung im Glutathion-Redoxstatus in der *bZIP6-1*-Mutante unabhängig von der *CAT3*-Expression. Um Ursachen für die Veränderung im Glutathion Redoxstatus zu finden und potentielle Ziele des Transkriptionsfaktors AtbZIP6 zu identifizieren, wurden in ersten Experimenten Affymetrix „GeneChip® Arabidopsis Genome“ Arrays mit fluoreszenzmarkierter RNA von unbehandelten *bZIP6-1*-Mutanten und dem entsprechenden Wildtyp hybridisiert. Insgesamt konnten 16 Gene identifiziert werden, die im unbehandeltem Wurzelgewebe der Mutante reprimiert waren. Darunter befand sich das stressresponsive Gen einer cytosolischen Isoform von Thioredoxin (At1g45145). Eine der Hauptaufgaben von Thioredoxin ist der Schutz zytosolischer Proteine vor Aggregation und Inaktivierung über die oxidative Bildung intra- bzw. intermolekularer

Disulfidbrücken (Arner und Holmgren, 2000). Ebenso konnte in *Clamydomonas reinhardtii* eine transkriptionelle Regulation eines Thioredoxin-Gens durch die Behandlung mit Cd^{2+} und Hg^{2+} beobachtet werden (Lemaire *et al*., 1999). Daneben nimmt Thioredoxin eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion ein. So konnte die Beteiligung von Thioredoxin an der Regulation des transkriptionellen Aktivators NF-κB demonstriert werden (Hirota *et al*., 1999; Schenk *et al*., 1994). In der Sonnenblume *Helianthus annus* wurde für den „Homeodomain"-Transkriptionsfaktor HaHR1 eine Beteiligung an der Redoxregulation über Thioredoxin nachgewiesen (Tron *et al*., 2002). In der thioredoxindefizienten *S. cerevisiae*-Mutante *trx1/2* wurde die Bedeutung von Thioredoxin als Protektor vor oxidativem Stress nachgewiesen (Mouaheb *et al*., 1998).

Zur weiteren Charakterisierung der *bZIP6-1*-Mutante sollten die beobachteten Cu^{2+}-spezifischen Phänotypen genauer untersucht sowie nach weiteren möglichen Cu^{2+} bzw. Cd^{2+}-spezifischen Phänotypen gesucht werden. Ebenso ist es wichtig, Unterschiede in der Expression der mittels Mikroarrays identifizierten Thioredoxin-Isoform mittels RT-PCR bzw. Northern-Blots zu analysieren.

Um unerwünschte Nebeneffekte durch mögliche weitere T-DNA-Insertionen in der *bZIP6-1*-Mutante ausschließen zu können, ist neben der Isolierung einer zweiten unabhängigen Knockout-Linie auch die genaue genetische Charakterisierung sowie die Komplementierung der Insertionslinien von größter Bedeutung.

Zur Identifizierung möglicher Zielgene von AtbZIP6 sollten in weiteren Affymetrix „GeneChip® Arabidopsis Genome" Array-Experimenten die transkriptionellen Unterschiede zwischen Cu^{2+}-behandelten *bZIP6-1*-Mutanten und dem Wildtyp untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, Zielgene unabhängig vom applizierten Stress zu untersuchen, ist die Verwendung von Überexpressionslinien z. B. in Mikroarrayexperimenten. Damit könnten erstmals Cu^{2+}-responsive Promotorelemente im Genom von *A. thaliana* identifiziert werden, die einen tieferen Einblick in die Cu^{2+}-Schwermetallhomöostase in Pflanzen zulassen würden.

4.6 Charakterisierung der *PP2C*

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen gehört zu den Hauptregulationsmechanismen zellulärer Prozesse. So kann beispielsweise die Enzymaktivität über den Phosphorylierungsstatus reguliert werden, indem es zu allosterischen Konformationsänderungen kommt, die den direkten Zugang zum aktiven Zentrum verhindern (Johnson und O'Reilly, 1996). Daneben spielt die Phosphorylierung u. a. bei der Bildung funktionaler Komplexe und der Lokalisierung eines Proteins innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle (Pawson, 1995; Luan, 2003).

Proteinphosphatasen werden aufgrund ihrer Substratspezifität in die Klassen der Serin- und Threonin-spezifischen, Tyrosin-spezifischen und dualspezifischen Phosphatasen eingeteilt. Serin- und Threonin-spezifische Proteinphosphatasen teilt man aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifitäten und pharmakologischen Eigenschaften in die Unterklassen der Proteinphosphatasen 1 (PP1) und Proteinphosphatasen 2 (PP2) ein. Eine weitere Unterteilung der

PP2-Unterklasse erfolgt nach der Abhängigkeit von divalenten Kationen. Für die Funktion der Proteinphosphatasen 2B (PP2B) ist Ca^{2+}, der Proteinphosphatasen 2C (PP2C) Mg^{2+} oder Mn^{2+} als Kofaktor essentiell. Dagegen benötigen Proteinphosphatasen 2A (PP2A) für die Dephosphorylierungsreaktion keine Ionen als Kofaktoren (Cohen, 1989).

4.6.1 Schwermetallspezifische Regulation der *PP2C*

Die Auswertung der cDNA-AFLP-Analyse für das schwermetallinduzierte Fragment 7 zeigte, dass es sich beim korrespondierenden Klon 7-1 um das homologe Gen zu eine Proteinphosphatase 2C (At2g30020) handelt.

Die Analyse flotierter Blätter mittels RT-PCR ergab, dass das Transkript der *PP2C* in beiden *Arabidopsis*-Spezies nach Behandlung mit 50µM Cu^{2+} stark und nach Behandlung mit hohen Cd^{2+}-Konzentrationen (100 µM) schwach akkumuliert. In *A. thaliana* wurde bereits durch 1 µM Cu^{2+} eine Transkriptakkumulation erreicht.

Untersuchungen des *PP2C*-Transkriptes in hydroponisch kultivierten *A. thaliana*-Pflanzen zeigten nach 2 h im Wurzelgewebe eine starke Akkumulation durch Cu^{2+} sowie nach 24 h eine schwache Akkumulation im Sprossgewebe.

In Mikroarrayexperimenten wurde für die untersuchte *PP2C* eine Induktion durch die Behandlung mit dem aus *Phytophthora parasitica* stammenden Elicitor NPP1 („**N**ecrosis inducing ***P****hytophtora* **P**rotein elicitor 1“) gezeigt (Dr. Thorsten Nürnberger, IPB Halle, persönliche Mitteilung). Zusätzlich konnte durch die Arbeiten von Cheong *et al.* (2002) eine 18-fache Induktion der Transkriptes der *PP2C* 30 min nach Verwundung gezeigt werden.

Die transkriptionelle Aktivierung weiterer PP2C als Antwort auf Stressfaktoren wurde durch Transkriptomanalysen in *A. thaliana* nach Verwundung, Kälte, osmotischen Stress und Salzstress beobachtet (Cheong *et al*., 2002; Kreps *et al*., 2002). Für die Proteinphosphatase 2C *MP2C* („**M**edicago **P**roteinphosphase **2C**“) aus *Medicago sativa* erfolgte ebenfalls eine transkriptionelle, transiente Aktivierung durch Verwundung (Meskiene *et al*., 1998). Für die Proteinphosphatasen 2C *ABI1* („**AB**A-**I**nsensitive 1;“) und *AtPP2CA* wurde eine ABA-abhängige transkriptionelle Aktivierung durch Kälte und Trockenheit gezeigt (Tähtiharju und Palva, 2001).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal für eine Proteinphosphatase 2C eine schwermetallspezifische Expression gezeigt werden. Dieses Ergebnis und die beschriebenen Beispiele für die stressinduzierte Expression von Proteinphosphatasen 2C geben Auskunft über deren mögliche Funktionen in der Regulation der stimulusspezifischen Signaltransduktion.

4.6.2 Phylogenetische Analyse der Proteinphosphatasen 2C aus *A. thaliana*

Da aufgrund enger verwandtschaftlicher Beziehungen innerhalb einer Gruppe über mögliche gemeinsame Regulationsmechanismen spekuliert werden kann, sollte diese Analyse darüber Aufschluss geben, ob die mittels cDNA-AFLP identifizierte *PP2C* mit weiteren PP2C eine eigenständige phylogenetische Gruppe bildet.

Mit Hilfe der phylogenetischen Untersuchung konnten die 33 untersuchten PP2C nach Kerk *et al*. (2002) in die Gruppen 1, 2, 3, 5, 6 bzw. 8 pflanzlicher Proteinphosphatasen 2C eingeteilt werden.
Die am besten charakterisierte phylogenetische Gruppe (1) ist an der Regulation der Signaltransduktion des Phytohormons ABA beteiligt. Für Proteinphosphatasen 2C ABI1 und ABI2 wurde eine regulatorische Beteiligung an der exogenen und endogenen ABA-Signaltransduktion gezeigt (Leung *et al*., 1994; 1997; Merlot *et al*., 2001). Ebenso konnte AtPP2C-HA („**PP2C** **H**omology to **A**BI1/ABI2“) sowie für PP2CA eine ABA-abhängige Regulation gezeigt werden (Rodriguez, 1998). Mit *NtPP2CA* wurde aus Tabak ein homologes Gen zu *AtPP2CA* isoliert, das als Kreuzungspunkt für die Regulation der Signaltransduktionswege von Hitzeschock, oxidativem Stress, Trockenstress bzw. ABA diskutiert wird (Vranova *et al*., 2000).
Die phylogenetische Analyse zeigte außerdem, dass die untersuchte PP2C mit zwei weiteren Proteinphosphatasen 2C (At2g40180 und At3g27140) eine eigenständige phylogenetische Gruppe (2) bildet, die sich deutlich von den restlichen analysierten PP2C abgrenzt. Die Untersuchungen von Kerk *et al*. (2002) konnten noch zwei weitere PP2C aus *A. thaliana* (At1g67820 und At1g07160) und die MP2C aus *M. sativa* dieser Gruppe zuordnen. Diese phylogenetische Gruppe zeichnet sich durch das Vorhandensein eines konservierten Cysteinrestes in der katalytischen Domäne der PP2C aus (Kerk *et al*., 2002). Zusätzlich besitzen alle Mitglieder dieser Gruppe eine einzigartige N-terminale Domäne, die für Protein-Interaktionen verantwortlich ist (Luang, 2003).
Aufgrund der phylogenetischen Einteilung der untersuchten PP2C mit zwei weiteren Proteinphosphatasen 2C in eine Gruppe wurden in RT-PCR-Analysen von schwermetallbehandeltem Wurzelgewebe mögliche Gemeinsamkeiten in der Regulation untersucht. Für die Proteinphosphatase 2C At2g40180 (*PP2C5*) konnte in dieser Arbeit ebenfalls ein Regulation durch Schwermetalle gezeigt werden. Daneben konnte für *PP2C5* eine ABA-abhängige Expression ausgeschlossen werden (Wang *et al*., 1999).
Die Proteinphosphatase *MP2C* aus *M. sativa* zählt ebenfalls zu dieser phylogenetischen Gruppe. Für sie konnte ein transkriptionelle Aktivierung durch Verwundung gezeigt werden (Meskiene *et al*., 1998). Auf Proteinebene wurde für MP2C *in vitro* die Inaktivierung der wundinduzierte MAP-Kinase SAMK („**S**tress **A**ctivated **M**AP**K**“) nachgewiesen (Meskiene *et al*., 1998). Zusätzlich unterdrückt MP2C in *S. cerevisiae* sowohl den Pheromon-induzierten als auch den osmoregulatorischen MAPK-Signaltransduktionsweg durch Inaktivierung der MAPK Kinase Kinase Ste11p (Meskiene *et al*., 1998). Die Beobachtung, dass die wundinduzierte Expression von *MP2C* mit der zeitlichen Inaktivierung des SAMK-Signalweges übereinstimmt, legt die Vermutung nahe, dass MP2C an der negativen Regulation des SAMK-Signalweges beteiligt ist (Rodriguez, 1998).
Außerdem ist die Aktivität der MP2C von der Zusammensetzung der Zellmembran abhängig. Ungesättigte Fettsäuren führen *in vitro* zu einer Inhibierung der Enzymaktivität der MP2C (Baudouin *et al*., 1999).
Die Beobachtung, dass sowohl die untersuchte *PP2C,* als auch *PP2C5* durch Schwermetalle transkriptionell reguliert werden, ist ein erster Hinweis, dass noch weitere Mitglieder dieser

phylogenetischen Gruppe an der Regulation der Schwermetallsignaltransduktion beteiligt sein könnten.

Da sowohl Schwermetallionen als auch H_2O_2 über den Prozess der Lipidperoxidation die Zusammensetzung der Zellmembran beeinflussen können (Ouariti *et al*., 1997; Sakihama *et al*., 2002), bzw. nach Schwermetallstress Proteinphosphorylierung beobachtet wurde (Suzuki *et al*., 2001), stehen mit Hilfe der Untersuchungen an MP2C weitere Hinweise über mögliche Regulationsmechanismen bzw. Zielproteine zur Verfügung.

Um diesen Hinweisen nachzugehen, sollte mit Hilfe von T-DNA-Insertionsmutanten die Funktion der charakterisierten PP2C hinsichtlich ihrer Beteiligung an der schwermetallspezifischen Signaltransduktion und mögliche regulatorische Einflüsse in schwermetallresponsiven MAPK-Kaskaden untersucht werden. Allerdings konnte nur eine Linie mit einer Insertion 85 bp stromaufwärts des Startkodons im Promotor der *PP2C* identifiziert werden, die keinen Einfluss auf die Expression der *PP2C* zeigte. Eine Analyse von inzwischen erhältlichen T-DNA-Insertionsmutante im kodierenden Bereich der *PP2C* (SALK_065126; SALK_104445) könnte zu einem größeren Verständnis der Funktion der PP2C beitragen. Ebenso könnten biochemische Untersuchungen an der rekombinanten PP2C nach Behandlung mit H_2O_2, Cu^{2+} oder ungesättigten Fettsäuren wichtige Informationen über ihre Regulation liefern.

4.7 Charakterisierung der MAPK

Biotische und abiotische Stressfaktoren führen in Pflanzen zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivierung spezifischer stressresponsiver Gene. Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) spielen eine wichtige Rolle in der Übermittlung der durch Rezeptoren oder Sensoren erkannten externen Stimuli in Pflanzen, Hefe und Mensch (Asai *et al*., 2002; Widmann *et al*., 1999).

MAPK sind Teil von Signaltransduktionskaskaden, den sogenannten MAPK-Kaskaden. Diese Kaskaden setzen sich aus den MAP-Kinasen und den übergeordneten MAPK-Kinasen (MAPKK) und MAPKK-Kinasen (MAPKKK) zusammen.

MAPKKK aktivieren MAPKK durch Phosphorylierung konservierter Serin- und Threoninreste, die ihrerseits MAPK an konservierten Tyrosin- und Threoninresten phosphorylieren und diese somit aktivieren. Eine Beteiligung von MAP-Kinasen an der pflanzlichen Signaltransduktion konnte für eine Vielzahl von Stimuli gezeigt werden. Dazu gehören mechanische Belastung (Mizoguchi *et al*., 1996; Bogre *et al*., 1996; Ichimura *et al*., 2000), Verwundung (Usami *et al*., 1995; Bogre *et al*., 1997; Seo *et al*., 1999; Zhang und Klessig, 1998a; Ichimura *et al*., 2000), Trockenheit oder Kälte (Mizoguchi *et al*., 1996; Jonak *et al*., 1996; Ichimura *et al*., 2000), Hitze (Sangwan *et al*., 2002; Heider *et al*., 1998), osmotischer Stress (Usami *et al*., 1995; Mizoguchi *et al*., 1996; Takahashi *et al*., 1997; Tena und Renaudin, 1998; Ichimura *et al*., 2000) und als Antwort auf den Befall mit Pathogenen (Suzuki und Shinshi, 1995; Zhang und Klessig, 1997; 1998a; 1998b; Romeis *et al*., 1999). Neben der Signaltransduktion durch die Phytohormone ABA (Knetsch *et al*., 1996), Ethylen (Kieber *et al*., 1993) und Auxin (Mizoguchi *et al*., 1996; Tena und Renaudin, 1998) sind MAP-

Kinasen auch an der Steuerung von Entwicklungsprozessen beteiligt (Samaj *et al*., 2003; Bogre *et al*., 1999; Wilson *et al*., 1997).

4.7.1 Charakterisierung der transkriptionellen Aktivierung

Mit Hilfe der cDNA-AFLP-Analyse erfolgte die Isolierung eines schwermetallresponsiven Fragmentes, das ebenso wie der bZIP-Transkriptionsfaktor durch die Behandlung mit Cu^{2+} induziert wurde. Die Sequenzanalyse des korrespondierenden Klones ergab eine Homologie zur MAPK *AtMPK4*.

Durch RT-PCR-Analysen konnte eine Cu^{2+}-spezifische Transkriptakkumulation von *MPK4* sowohl in *A. halleri* als auch in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Daneben konnte in *A. thaliana* eine schwache Induktion des Transkriptes durch Behandlung mit Cd^{2+} gezeigt werden. Alle weiteren untersuchten Stressbehandlungen zeigten keinen Einfluss auf die Transkriptakkumulation von *MPK4*. Nach Behandlung mit Salz, Kälte, Trockenheit, Verwundung und mechanischer Beanspruchung wurde keine Veränderungen im Expressionsmuster von *AtMPK4* beobachtet (Ichimura *et al*., 2000). Ebenso konnte keine Induktion des *AtMPK4*-Transkriptes durch die Behandlung mit dem bakteriellen Elicitor Harpin festgestellt werden (Desikan *et al*., 2001).

Untersuchungen zur gewebespezifischen Induktion nach Behandlung mit Schwermetallen ergab, dass das Transkript von *AtMPK4* im Wurzelgewebe Cu^{2+}-spezifisch induziert wurde. *In situ* PCR-Experimente zeigten dagegen, dass *AtMPK4* konstitutiv in allen untersuchten oberirdischen Geweben exprimiert wird (Petersen *et al*., 2000).

Eine erneute Analyse der inzwischen nahezu vollständig annotierten Gendatenbank von *A. thaliana* (Wortman *et al*., 2003) ergab für den bereits beschriebenen *A. halleri*-Klon eine wesentlich höhere Homologie zum *AtMPK11*-Gen. Phylogenetische Analysen zeigten, dass *AtMPK4, AtMPK11* und *AtMPK12* eine eigenständige Gruppe innerhalb der MAPK aus *A. thaliana* bilden (Ichimura *et al*., 2002). Dabei zeigte sich, dass die für die RT-PCR-Analysen von *MPK4* verwendeten Primer nicht nur das *AtMPK4*-Gen sondern auch *AtMPK11* erkannten. Mit spezifischen Primern für *MPK4* konnten die Beobachtungen von Ichimura *et al*. (2000) und Petersen *et al*. (2000), dass *AtMPK4* ein konstitutives Expressionsmuster besitzt, bestätigt werden.

Dagegen konnte für das Transkript von *MPK11* in *A. halleri* und *A. thaliana* eine spezifisch Induktion durch Cu^{2+} nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine Induktion des Transkriptes von *AtMPK11* durch Cd^{2+} und osmotischen Stress (NaCl) beobachtet.

Wie in der Literatur beschrieben, wurden bereits eine Reihe von MAP-Kinasen aus *A. thaliana* auf eine mögliche Transkriptakkumulation nach Behandlung mit verschiedenen Stressfaktoren untersucht. So konnte für die Transkripte der *AtMPK1, AtMPK3* und *AtMEKK1* eine Induktion durch osmotischen Stress und mechanische Beanspruchung gezeigt werden. Zusätzlich sind die Transkripte der *AtMPK3* und *AtMEKK1* auch durch Kälte induzierbar (Mizoguchi *et al*., 1996). Die Transkripte der *AtMPK3* und *AtMPK4* waren durch Bestrahlung mit UV-Licht induzierbar (Ulm *et al*., 2002). Dagegen konnte eine transkriptionelle Aktivierung von *AtMPK6* durch Stress bisher nicht gezeigt werden (Ichimura *et al*., 2000; Desikan *et al*., 2001). Die transkriptionelle Aktivierung

der MAP-Kinasen *OsMSRMK2*, *OsMSRMK3* („**M**ultiple **S**tress **R**esponsive **M**AP **K**inase 2, 3“) und *OsWJUMK1* („**W**ound- and **J**A-**U**ninducible **M**AP **K**inase 1“) aus Reis erfolgte durch verschiedene Stimuli wie z. B. Schwermetalle, H_2O_2, Verwundung, Gibberelline und JA (Agrawal *et al*., 2002; 2003). Daneben wurde für die MAPKK-Kinase *AtMEKK1* aus *A. thaliana* eine Cd^{2+}-spezifische Induktion des Transkriptes gezeigt (Suzuki *et al*., 2001) Somit sind die erhaltenen RT-PCR-Daten von *AtMPK11* ein erster Hinweis, dass die Aktivierung von MAP-Kinasen in der schwermetallspezifischen Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt.

4.7.2 Posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle

Eine posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen nach Behandlung mit Schwermetallen konnte bisher nur im Nematoden *C. elegans* gezeigt werden. Nach der Aufnahme von Cu^{2+} bzw. Cd^{2+} wurden im Bereich des Magens die MAPKK MEK1 und die JNK Kinase1 („**J**un **N**-terminal **K**inase“) aktiviert (Koga *et al*., 2000; Villanueva *et al*., 2001). Mit Hilfe einer *mek-1* Deletionsmutante konnte eindrucksvoll nachgewiesen werden, dass MEK1 für die Schwermetalltoleranz in *C. elegans* notwendig ist (Koga *et al*., 2000). Ebenso konnte dieser Zusammenhang in Jurkat Säugetier-Zelllinien mit der Aktivierung des p38- und JNK-Signaltransduktionsweges durch Cd^{2+} gezeigt werden (Takagi *et al*., 2002). Diese Beispiele aus dem tierischen Sektor belegen die Bedeutung von MAPK-Signalwegen für die Aktivierung von Toleranzmechanismen. Einen ersten Hinweis, dass Proteinphosphorylierung an der schwermetallspezifischen Signaltransduktion in Pflanzen beteiligt ist, konnten Suzuki *et al*. (2001) durch Inhibitorstudien demonstrierten . In Petersilie-Zellkulturen konnte darüber hinaus die posttranslationale Aktivierung der MAP-Kinase PcMPK6 durch Cu^{2+} und Cd^{2+} gezeigt werden (Kroj *et al*., 2003).

Mit Hilfe von MBP *In-Gel*-Kinaseversuchen und Western-Blot-Analysen mit anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörpern sollte der Einfluss von Schwermetallen auf die posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen in *A. thaliana* untersucht werden. Mit beiden Methoden konnte übereinstimmend eine schnelle und für die Dauer der Stressbehandlung anhaltende Aktivierung von mindestens zwei MAP Kinasen mit den molekularen Massen im Bereich von 43 kDa und 47 kDa im Wurzelgewebe von *A. thaliana* nach Behandlung mit Cu^{2+} bzw. Cd^{2+} gezeigt werden. Dabei war die Aktivierung jeweils nach 20 min maximal.

Während durch Cu^{2+} eine starke Aktivierung der MAP-Kinasen beobachtet wurde, erfolgte durch Cd^{2+} eine vergleichsweise schwache Aktivierung. Bereits 5 min nach Beginn der Schwermetallbehandlung konnte die Aktivierung der MAP-Kinasen durch Phosphorylierung des T^PEY^P-Motives beobachtet werden. Die Aktivierungsprofile und –intensitäten der detektierten MAP-Kinasen waren in den MBP *In-Gel*-Kinaseversuchen und den Western-Blot-Analysen sehr unterschiedlich. So dominierte in den MBP *In-Gel*-Kinaseversuchen die 47 kDa-MAPK, wohingegen die 43 kDa-MAPK kaum oder nur sehr schwach nachweisbar war. In den durchgeführten Western-Blot-Analysen war es möglich, die 47 kDa- und die 43 kDa-MAPK in ähnlicher Bandenintensität darzustellen. Diese Unterschiede deuten daraufhin, dass die 43 kDa-

MAPK, trotz vorhandenen T^PEY^P-Motives, entweder nicht in der Lage war MBP als Substrat zu verwenden oder durch unvollständig Renaturierung eine stark reduzierte Enzymaktivität besaß.
Vergleichbare MAPK-Aktivierungsmuster finden sich auch nach der Behandlung mit unterschiedlichen abiotischen Stressfaktoren oder dem Befall mit Pathogenen. In *A. thaliana* konnte die schnelle und transiente Aktivierung einer 47 kDa- und einer 43 kDa-MAPK als Reaktion auf unterschiedliche Umwelteinflüsse, wie Kälte, mechanische Beanspruchung, Trockenheit, Verwundung, hypo- bzw. hyperosmotischem Stress, gezeigt werden (Ichimura *et al*., 2000). Immunopräzipitationsexperimente mit spezifischen Antikörpern gegen AtMPK6 und AtMPK4 zeigten, dass es sich bei der 47 kDa-MAPK um AtMPK6 und bei der 43 kDa-MAPK um AtMPK4 handelt (Ichimura *et al*., 2000). Diesen Ergebnissen widersprechen allerdings die Ergebnisse von Petersen *et al*. (2000), die AtMPK4 als negativen Regulator der systemisch erworbenen Resistenz mit konstitutiver Aktivierung charakterisieren.
Mit Hilfe von *A. thaliana*-Suspensionskulturen konnte unter hypoosmotischen Bedingungen eine schnelle, starke und transiente Aktivierung von drei MAPK in einem molekularen Massenbreich von 37, 39 und 44 kDa gezeigt werden (Droillard *et al*., 2002). Bei der 44 kDa-MAPK handelt es sich um AtMPK6 und bei der 39 kDa-MAPK um AtMPK3. Für beide MAPK konnte ein Zusammenhang zwischen hypoosmotischem Stress und mechanischer Beanspruchung beobachtet werden (Droillard *et al*., 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in Tabakzellkulturen gemacht. Dabei erfolgte die Aktivierung der MAP-Kinasen SIPK („**S**tress **I**nduced **P**rotein **K**inase“) und WIPK („**W**ound **I**nduced **P**rotein **K**inase“) sowohl durch hyperosmotischen Stress als auch durch mechanische Beanspruchung (Droillard *et al*., 2000). Unter schwach hyperosmotischen Bedingungen konnte die nachhaltige Aktivierung von zwei MAPK in einem Massebereich von 37 und 44 kDa, unter stark hyperosmotischen Bedingungen die nachhaltige Aktivierung von AtMPK6 und einer MAPK im Bereich von 37 kDa demonstriert werden (Droillard *et al*., 2002). Vergleichbare, dosisabhängige Aktivierungsmuster wurden in *Medicago sativa* für die Aktivierung von SIMK („**S**tress-**I**nducible **M**AP **K**inase“) und einer 38 kDa-MAPK gezeigt (Munnik *et al*., 1999). Vergleicht man allerdings die Aktivierung der PcMPK6 aus Petersilie mit allen anderen charakterisierten MPK6-orthologen MAPK so fällt auf, dass neben den PAMP („**P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**atterns“) PEP-13 und HrpZ nur die abiotischen Faktoren wie H_2O_2 und Schwermetalle in der Lage sind, PcMPK6 zu aktivieren (Kroj *et al*., 2003). So erfolgte weder durch hyper- noch durch hypoosmolare Bedingungen oder durch SA eine Aktivierung von PcMPK6 (Kroj *et al*., 2003). Auffällig ist, dass die Amplitude der Aktivierung stresspezifisch ist. So betrug die Stärke der Aktivierung durch H_2O_2 nur ~35%, durch Schwermetalle nur ~20% der Aktivierung durch PEP-13 (Kroj *et al*., 2003).
In tierischen Zelllinien konnte zudem gezeigt werden, dass eine starke transiente Aktivierung der MAP-Kinase ERK („**E**xtracellular **R**egulated **K**inase“) zu einer unterschiedlichen zellulären Antwort führt, als eine dauerhafte und nachhaltige Aktivierung der ERK (Marshall, 1995). Im Gegensatz zu den meisten untersuchten Stressen erfolgte nach der Behandlung mit Schwermetallen eine dauerhafte Aktivierung von mindestens zwei MAP-Kinasen, die nach 20 min maximal war.

4.7.3 Charakterisierung der schwermetallspezifischen Aktivierung von MAP-Kinasen im Spross

Wie bereits beschrieben waren sowohl Cd^{2+} als auch Cu^{2+} in der Lage, eine 47 und 43 kDa-MAPK im Wurzelgewebe zu aktivieren. Allerdings konnte keine Aktivierung von MAPK durch Cd^{2+} im Spross detektiert werden. Da sowohl in *A. thaliana* als auch in *A. halleri* der Transport von Cd^{2+} in den Spross und die Akkumulation in Blatttrichomen nachgewiesen werden konnte (Ager *et al*., 2002; Zhao *et al*., 2000), kann im Falle von Cd^{2+} von einer wurzelspezifischen Erkennung und Signaltransduktion über MAPK-Kaskaden ausgegangen werden.

Im Gegensatz dazu konnte nach der Behandlung mit 125 µM Cu^{2+} neben der erwarteten Aktivierung von zwei MAP-Kinasen im Wurzelgewebe, bereits nach 2 h auch im Sprossgewebe eine Aktivierung von MAP-Kinasen mit den molekularen Massen im Bereich von 43 kDa und 47 kDa beobachtet werden. Im Gegensatz zu Cd^{2+} deutet dieses Ergebnis auch auf eine Erkennung und spezifische Signaltransduktion als Antwort auf erhöhte Cu-Konzentrationen im Spross hin. Die Untersuchung der MAPK-Aktivierung in Abhängigkeit von den extrazellulär angebotenen Cu^{2+}-Konzentrationen sollte Aufschluss über die Sensitivität dieser Aktivierung geben. So konnte mit Hilfe flotierter *A. thaliana*-Blätter gezeigt werden, dass 1 bzw. 5 µM Cu^{2+} ausreichend sind, eine 47 und eine 43 kDa-MAPK zu aktivieren. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass bereits geringste Schwankungen der intrazellulären Cu^{2+}-Konzentration zur Aktivierung von MAP-Kinasen führen.

Die Messung der in den Spross aufgenommenen Menge an Cu und deren Korrelation mit der MAPK-Aktivierung könnten auf einen für Cu-Ionen spezifischen Signalweg im Wurzel- und Sprossgewebe hinweisen. Dabei würde sich neben der Detektion des Cu-Gehaltes mittels Atomabsorptionsspektrometrie auch die Verwendung von spezifisch durch Cu-Ionen induzierbaren Markergenen anbieten. Daneben könnten Veränderung des Cu-Gehaltes im Spross mit Hilfe von transgenen *A. thaliana*-Linien untersucht werden. Diese Linien enthalten einen Cu-induzierbaren Promotor aus Hefe, der an GFP fusioniert wurde (Granger und Cyr, 2001). Damit wäre man in der Lage, Veränderungen im intrazellulären Gehalt an Cu-Ionen durch Intensitätsunterschiede in der GFP-Fluoreszenz sichtbar zu machen.

4.7.4 Immunologische Charakterisierung der schwermetallresponsiven Kinasen

Aufgrund der Annahme das *AtMPK4* durch Schwermetalle transkriptionell reguliert ist, wurde wie bei Ichimura *et al*. (2000) beschrieben, ein 16 AS langes C-terminales Peptid von AtMPK4 zur Herstellung polyklonaler Antikörper benutzt. Die Analyse der Seren zeigte jedoch, dass die Antikörper nicht spezifisch für AtMPK4 waren (Daten nicht gezeigt).

Datenbankanalysen des Peptids zeigten zudem, dass der von Ichimura *et al*. (2000) ausgewählte Bereich hohe Identität mit den MAP-Kinase AtMPK11 und AtMPK12 aufweist, so dass Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen MAPK nicht auszuschließen sind.

Mit Hilfe der *mpk4*-Knockout-Mutante konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Petersen *et al*. (2000) gezeigt werden, dass AtMPK4 posttranslational nicht durch Schwermetalle aktiviert wird. Ebenso kann bei den Untersuchungen von Ichimura *et al*. (2000), sowie Desikan *et*

al. (2001) nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der unter Verwendung des anti-AtMPK4-Antikörpers gezeigten MAPK-Aktivität nicht um AtMPK4, sondern um AtMPK11 oder AtMPK12 handelt.

Unter Verwendung eines spezifischen anti-AtMPK6-Antikörpers (Ichimura *et al*., 2000) konnte in Immunopräzipitationsexperimenten mit anschließendem MBP-Kinasephosphorylierungsassay die posttranslationale Aktivierung von AtMPK6 durch Cu^{2+} gezeigt werden. Die molekulare Masse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von AtMPK6 liegt im Bereich von 47 kDa. Somit ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der aktivierten 47 kDa-MAPK um AtMPK6 handelt. Immunopräzipitationsexperimente gekoppelt mit massenspektroskopischer Analyse könnten diese Frage endgültig klären. Ein weiteres Indiz für die posttranslationale Aktivierung von AtMPK6 durch Schwermetalle ist, dass in Petersilie PcMPK6, das orthologe Protein zu AtMPK6, ebenfalls durch Schwermetalle aktiviert wird (Kroj *et al*., 2003).

Außerdem zeigten die Untersuchungen an Petersilie-Zellkulturen, dass PcMPK3 nicht durch Schwermetalle aktiviert wird (Kroj *et al*., 2003). Da das *A. thaliana* Ortholog AtMPK3 ebenfalls eine molekulare Masse von ungefähr 43 kDa besitzt, ist dies ein erster Hinweis, dass es sich bei der schwermetallaktivierten 43 kDa MAPK nicht um AtMPK3 handelt. Zur Identifizierung der 43 kDa-MAPK sind mehrere Ansätze denkbar. Ein Hauptkandidat ist AtMPK11, da deren Transkript wie schon beschrieben durch Schwermetalle reguliert wird und die abgeleitete Aminosäuresequenz eine molekulare Masse von 42,4 kDa besitzt. Neben der Herstellung spezifischer Antikörper gegen AtMPK11 und nachfolgenden Immunopräzipitationsexperimenten wäre auch die Charakterisierung einer erhältlichen putativen *AtMPK11* T-DNA-Insertionslinie (SALK_049352) hinsichtlich ihres schwermetallspezifischen MAPK-Aktivierungsmusters von großem Nutzen. Ebenso könnten durch Immunopräzipitation mit dem anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper, gekoppelt mit 1D- oder 2D-Geleelektrophorese und anschließender massenspektroskopischer Analyse, schwermetallspezifisch aktivierte MAP-Kinasen identifiziert werden.

4.7.5 Die Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle ist in Pflanzen Teil eines konservierten Signaltransduktionsweges

Neben der schwermetallspezifischen Aktivierung von AtMPK6 und einer 43 kDa-MAPK in *A. thaliana* wurde im Metallophyten *A. halleri* ein identisches MAPK-Aktivierungsmuster nachgewiesen. Untersuchungen in Petersilie-Zellkulturen zeigten ebenfalls eine Aktivierung von PcMPK6 durch Schwermetalle (Kroj *et al*., 2003).

Western-Blot-Analysen schwermetallbehandelter *A. thaliana*-Zellkulturen zeigten ebenfalls nur die Aktivierung einer 47 kDa-MAPK (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass übergeordnete Komponenten der 43 kDa-MAPK in den Zellkulturen nicht mehr benötigt und somit nicht mehr hergestellt werden, oder die zur 43 kDa-MAPK gehörende Signaltransduktionskaskade ausschließlich wurzelspezifisch und in den aus Blättern gewonnen Zellkulturen nicht vorhanden ist.

Die in mehreren Pflanzenspezies konservierte Aktivierung von MPK6 durch Schwermetalle weist auf die Beteiligung von MPK6 an einer schwermetallspezifischen Signaltransduktion in Pflanzen hin.

Neben einer Aktivierung von MPK6-Orthologen durch die bereits beschriebenen abiotischen Stressfaktoren wurde die posttranslationale Aktivierung von MPK6 in verschiedenen Systemen auch durch biotische Stressfaktoren beschrieben. So wurde in Tabak für SIPK („ **S**alicylate **I**nduced **P**rotein **K**inase“ = NtMPK6) die Aktivierung durch allgemeine Elicitoren (Droillard *et al*., 2000; Lee *et al*., 2001), nach Infektion mit TMV (Zhang und Klessig, 1998b) oder durch rassespezifische Elicitoren (Romeis *et al*., 1999) beschrieben. In *Medicago sativa* erfolgte die Aktivierung der SIMK durch unterschiedliche pilzliche Elicitoren (Cardinale *et al*., 2000). Die Elicitoren PEP-13 und HrpZ waren in der Lage, PcMPK6 zu aktivieren (Kroj *et al*., 2003). Für AtMPK6 wurde eine Aktivierung durch das flg22-Peptid des bakteriellen Elicitors Flagellin sowie durch Harpin nachgewiesen (Nuhse *et al*., 2000; Desikan *et al*., 1999b).

Für die meisten MPK6-Orthologen konnten übergeordnete MAPKK identifiziert werden. Die Aktivierung der Tabak SIPK erfolgte durch NtMEK2 (Yang *et al*., 2001). Ebenso konnte die Aktivierung der SIMK durch SIMKK nachgewiesen werden (Kiegerl *et al*., 2000). In *A. thaliana* wurde für den bakteriellen Elicitor Flg22 die komplette Signaltransduktionskaskade aufgeklärt (Asai *et al*., 2002). Nach der Flg22-Perzeption durch eine RLK erfolgt die Übertragung des Signals in Abhängigkeit von der RLK FLS2 („**FL**agellin **S**ensitive 2“) über MEKK1, MKK4 bzw. MKK5 und AtMPK3 und AtMPK6 auf die WRKY-Transkriptionsfaktoren WRKY22/29, die in einem positiven „Feedbackloop“ die eigene Transkription aktivieren, und gleichzeitig für die Aktivierung von stressresponsiven Genen verantwortlich sind (Asai *et al*., 2002). Neben MEKK1 ist auch die MAPKKK ANP1 als Aktivator von AtMPK6 und AtMPK3 beschrieben (Kovtun *et al*., 2000). Im Unterschied zu MEKK1 ist ANP1 Startpunkt einer H_2O_2-responsiven MAPK-Kaskade und aktiviert AtMPK6 nur sehr schwach über MKK5 (Kovtun *et al*., 2000; Asai *et al*., 2002). Eine solche gemeinsame Benutzung einzelner Komponenten aus Signaltransduktionskaskaden zur Weiterleitung unterschiedlichster Stimuli ist in *S. cerevisiae* an die Existenz sogenannter „scaffold“-Proteine gebunden.

„Scaffold“-Proteine bilden das Rückgrad von Signalosomen, in denen komplette MAPK-Signaltransduktionskaskaden in einer optimalen räumlichen Orientierung zueinander angeordnet sind (Elion, 2001). *S. cerevisiae* besitzt drei analoge „scaffold“ Proteine, die eine sehr große Divergenz besitzen (Elion, 2001; 1998).

Beispielsweise ist das Pbs2 „scaffold“-Protein („**P**olymyxin **B** **S**ensitive 2“) in der Lage, selbst als MAP-Kinase zu fungieren (Schaeffer und Weber, 1999). Das Ste5p-Signalosom („**STE**rility Gene 5 Protein“) ist an der Weiterleitung einer Vielzahl unterschiedlicher Signale beteiligt, die z. B. zur Regulation der Zellteilung und des Wachstums führen, pseudohyphales Wachstum einleiten, für die Integrität der Zellwand sorgen oder die Reaktion auf hyperosmotische Umweltbedingungen steuern (Elion, 2000; Roberts und Fink, 1994; Lee und Elion, 1999; O'Rourke und Herskowitz, 1998). Dabei sind die MAPKKK-Kinase Ste20p und die MAPKKK Ste11p ein gemeinsamer Bestandteil aller Signaltransduktionswege, andere MAP-Kinasen wie Fus1p („Cell **FUS**ion 1 Protein“) oder

Kss1p („**K**inase **S**upressiong **S**ST2 1 Protein“) sind dagegen nur in bestimmten Wegen anzutreffen (Elion, 2001). Diese große Flexibilität in der Weiterleitung wird durch Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Signalosomenkomplexe stark erhöht (Yablonski *et al*., 1996).
Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte in Pflanzen kein analoges „scaffold“-Protein identifiziert werden. Die Aktivierung von AtMPK6 durch unterschiedliche MAPKKK aufgrund verschiedener Stimuli legt die Vermutung nahe, dass auch pflanzliche MAPK-Kaskaden Teil von Signalosomen sind, die durch „scaffold“-Proteine organisiert werden.
Eine Möglichkeit einzelne Mitglieder solcher Signalosomen zu identifizieren, ist die Verwendung von Epitop-markierten Proteinen. Dabei werden bestimmte Epitope wie das Haemagglutinin-Tag (HA-Tag) oder das TAP-Tag („**T**andem **A**ffinity **P**urification“) mit Proteinen fusioniert und im Organismus exprimiert (Rigaut *et al*., 1999). Mit Hilfe dieser Tags ist es dann möglich Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen zu reinigen. In Kombination mit massenspektrometrischen Methoden könnten anschließend einzelne Proteine dieser Komplexe identifiziert werden. So könnten mit Hilfe dieser Methoden mögliche Interaktionspartner wie übergeordnete Kinasen, „scaffold“-Proteine aber auch MAPK-Substrate identifiziert werden.

4.9 Ausblick

In zukünftigen Arbeiten über Schwermetalltoleranzmechanismen in *A. halleri* sollten die gewonnenen Daten zur hohen Sequenzidentität zwischen *A. halleri* und *A. thaliana* im kodierenden Bereich als Grundlage für vergleichende Hybridisierungsexperimente von erhältlichen *A. thaliana*-Mikroarrays genutzt werden.
Zusätzlich könnten Hybridisierungen entsprechender Mikroarrays mit Proben, die aus genomischer DNA hergestellt wurden, Aufschluss über die Abhängigkeit der Schwermetalltoleranz von der Kopienanzahl einzelner Gene geben.
Die Untersuchung von schwermetallspezifischen Signaltransduktionswegen könnte ebenfalls mittels *A. thaliana*-Mikroarrays erfolgen. So könnten Expressionsunterschiede im kompletten Transkriptom von *A. thaliana* untersucht werden, die dann einen Überblick über die schwermetallspezifische Expression und der daraus abgeleiteten schwermetallspezifischen Signaltransduktion geben würden.
Für die Klärung der Rolle des Transkriptionsfaktors AtbZIP6 in der Schwermetallsignal-transduktion ist es notwendig, die *bZIP6-1*-Mutante biochemisch sowie molekularbiologisch weiter zu charakterisieren. Mit Hilfe der generierten AtbZIP6-Überexpressionslinien sollte es möglich sein, Zielgene von AtbZIP6 und AtbZIP6-spezifische Elemente in den Promotoren dieser Zielgene zu identifizieren.
Um eine Beteiligung der untersuchten PP2C an der schwermetallspezifischen Signaltransduktion zu belegen, wäre eine homozygote T-DNA-Insertionsmutante in der kodierenden Sequenz der *PP2C* hilfreich. Neben phänotypischen Toleranzstudien könnten mit Hilfe der Knockout-Mutante auch Studien zu einer möglichen Beteiligung der PP2C an der Regulation von MAPK-Kaskaden auf Proteinebene durchgeführt werden.

Im Rahmen der Untersuchungen zur schwermetallspezifischen MAPK-Aktivierung sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob es sich bei der zweiten aktivierten MAP-Kinase mit einer molekularen Masse im Bereich von 43 kDa um MPK11 handelt. Durch die Verwendung von Peptidantikörpern, die spezifisch für MPK11 sind, sollte in Immunopräzipitationsexperimenten eine Antwort auf diese Frage gefunden werden.

Für MAPK-Kaskaden aus *S. cerevisiae* wurde eine Organisation in Signalosomen beschrieben (Elion, 2001). Solche Proteinkomplexe konnten für pflanzliche MAPK-Kaskaden noch nicht identifiziert werden. Mit Hilfe von Epitop-markierten Proteinen (TAP-Tag) könnte die Reinigung intakter Proteinkomplexe gezeigt und einzelne Mitglieder dieser Komplexe identifiziert werden (Rigaut *et al.*, 1999).

So könnten durch die Expression z. B. HA- oder TAP-markierter Versionen von MPK11 auch mögliche Interaktionspartner in *A. thaliana* identifiziert werden.

Zusammenfassung

Einige Schwermetalle sind essentiell für das Leben. Diese essentiellen Mikroelemente sind aber gleichzeitig auch toxisch. Um die Aufnahme, den Transport und die Verteilung der Schwermetallionen an die Orte des Bedarfs zu gewährleisten aber gleichzeitig das Auftreten toxischer Konzentrationen zu vermeiden, muß jeder dieser Schritte kontrolliert werden. Diese Kontrolle setzt das Vorhandensein von Signaltransduktionswegen voraus. Allerdings ist in Pflanzen nur wenig über schwermetallspezifische Signaltransduktionswege bekannt (Xiang und Oliver, 1998; Clemens, 2001).
Ziel dieser Arbeit war es deshalb, durch Schwermetallbehandlung differenziell exprimierte Gene im Metallophyten *Arabidopsis halleri* mit möglichen Signaltransduktionseigenschaften zu isolieren und anschließend im nahe verwandten pflanzlichen Modellsystem *Arabidopsis thaliana* molekular sowie funktionell zu charakterisieren.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden mit Hilfe der cDNA-AFLP-Analyse nach Schwermetallbehandlung 278 differentiell exprimierter Genfragmente im Metallophyten A*rabidopsis halleri* identifiziert. Für insgesamt 111 Fragmente wurden homologe Sequenzen in *Arabidopsis thaliana* erhalten. Innerhalb der kodierenden Sequenz wurde eine Sequenzidentität von 94,2 % zwischen beiden *Arabidopsis*-Spezies ermittelt.
Insgesamt wurde die differentielle Expression von 19 Fragmenten mit Hilfe von RT-PCR-Analysen und Makroarrays bestätigt. Eine nähere Charakterisierung erfolgte für drei ausgewählte Gene, deren Sequenzen Homologie zu Signaltransduktionskomponenten besaßen. Dabei handelte es sich um den basischen Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor bZIP6, eine Proteinphosphatase 2C und die MAP-Kinase MPK11.

Für den bZIP-Transkriptionsfaktor *bZIP6* wurde eine transkriptionelle Aktivierung durch Cu^{2+} und Cd^{2+} in beiden *Arabidopsis*-Spezies beobachtet. Nach Schwermetallbehandlung akkumulierte das Transkript von *AtbZIP6* (At2g22850) im Wurzelgewebe und schwächer im Spross. Neben Schwermetallen führte auch osmotischer Stress zur Akkumulation des *AtbZIP6*-Transkriptes. Um Hinweise über eine möglich Funktion von AtbZIP6 in der Schwermetallsignaltransduktion zu erhalten, wurde eine homozygote T-DNA-Insertionslinie im Bereich der kodierenden Sequenz von *AtbZIP6* identifiziert. Untersuchungen zum Phänotyp der *bZIP6-1*-Mutante zeigten, dass auf Cu^{2+}-haltigem Medium gekeimte Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp einen verringerten Chlorophyllgehalt besaßen. Zusätzlich konnte nach Cu^{2+}-Behandlung eine Verschiebung des Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion zu Gunsten von oxidiertem Glutathion beobachtet werden. Durch die Hybridisierung von Mikroarrays, erfolgte die Identifizierung möglicher Zielgene des bZIP-Transkriptionsfaktors.

Für eine Proteinphosphatase 2C konnte mittels RT-PCR eine Transkriptakkumulation durch Cu^{2+} und Cd^{2+} in beiden *Arabidopsis*-Spezies gezeigt werden. Dabei wurde im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* eine starke Transkriptakkumulation der *PP2C* (At2g30020) nach Cu^{2+}-Behandlung festgestellt. Schon Cu^{2+}-Konzentrationen ab 1 µM führten zu einer Induktion des *PP2C*-Transkriptes. Transkriptanalysen einer phylogenetisch eng verwandten PP2C (At2g40180) zeigten ebenfalls eine Regulation durch Schwermetalle.

Für das cDNA-AFLP-Fragment 10 konnte eine Aktivierung durch Cu^{2+} gezeigt werden. Die Sequenz des korrespondierenden Klons besaß Homologie zur MAP-Kinase *MPK11* (At1g01560). RT-PCR-Analysen bestätigten die im cDNA-AFLP beobachtete transkriptionelle Aktivierung durch Cu^{2+}. Zusätzlich wurde noch eine schwache Akkumulation des *AtMPK11*-Transkriptes durch Cd^{2+} und osmotischen Stress gezeigt. Die durch Cu- und Cd-Ionen bedingte Transkriptakkumulation konnte im Wurzelgewebe bestätigt werden.

Nach der transkriptionellen Aktivierung von *AtMPK11* durch Schwermetalle wurde auch die posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen durch Schwermetalle untersucht. Die Behandlung mit Cu^{2+} und Cd^{2+} führte im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* zur Aktivierung von zwei MAP-Kinasen mit molekularen Massen im Bereich von 47 kDa und 43 kDa. Nur durch Cu^{2+} konnte im Spross eine Aktivierung von zwei MAP-Kinasen beobachtet werden. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde die 47 kDa-MAP-Kinase als AtMPK6 identifiziert. Untersuchungen zur MAPK-Aktivierung in einer *mpk4*-Knockoutmutante konnten die Beteiligung von AtMPK4 an der Schwermetallsignaltransduktion ausschließen.

Affymetrix. (2001). Affymetrix ® Microarray Suite User's Guide (Santa Clara: Affymetrix).

Ager, F.J., Ynsa, M.D., Dominguez-Solis, J.R., Gotor, C., Respaldiza, M.A., Romero, L.C. (2002). Cadmium localization and quantification in the plant *Arabidopsis thaliana* using micro-PIXE. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater. Atoms **189,** 494-498.

Agrawal, G.K., Agrawal, S.K., Shibato, J., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2003). Novel rice MAP kinases *OsMSRMK3* and *OsWJUMK1* involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **300,** 775-783.

Agrawal, G.K., Rakwal, R., Iwahashi, H. (2002). Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. Biochem. Biophys. Res. Commun. **294,** 1009-1016.

Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., Schroeder, J.I. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. Nature **411,** 1053-1057.

Allen, G.J., Kwak, J.M., Chu, S.P., Llopis, J., Tsien, R.Y., Harper, J.F., Schroeder, J.I. (1999). Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. Plant J. **19,** 735-747

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215,** 403-410.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. **25,** 3389-3402.

Anderson, C.W.N., Brooks, R.R., Stewart, R.B., Simcock, R. (1998). Harvesting a crop of gold in plants. Nature **395,** 553-554.

Andrews, N.C. (2002). Metal transporters and disease. Curr. Opin. Chem. Biol. **6,** 181-186.

Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T., Nies, D.H. (1999). CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp strain CH34. J. Bacteriol. **181,** 6876-6881.

Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H. (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants. Plant J. **20,** 171-182.

Arner, E.S., Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur. J. Biochem. **267,** 6102-6109.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. Nature **415,** 977-983.

Assuncao, A.G.L., Martins, P.D., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M. (2001). Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ. **24,** 217-226.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1989). Current Protocols in Molecular Biology. (New York: John Wiley and Sons, Inc.).

Avsian-Kretchmer, O., Eshdat, Y., Gueta-Dahan, Y., Ben-Hayyim, G. (1999). Regulation of stress-induced phosholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. Planta **209,** 469-477.

Bachem, C.W., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. Plant J. **9,** 745-753.

Bailey, T.L., Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In Proceedings of Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (Melno Park, California: AAAI Press), 28-36.

Bailey, T.L., Gribskov, M. (1998). Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. Bioinformatics **14,** 48-54.

Baker, A.J.M., Brooks, R.R. (1989). Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements - A review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry. Biorecovery **1,** 81-126.

Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. (2000). Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In Phytoremediation of contaminated soil and water. N. Terry, G. Banuelos, and J. Vangronsveld, (Boca-Raton, FL, USA: Lewis Publishers), 85-107.

Balandin, T., Castresana, C. (2002). AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. Plant Physiol. **129,** 1852-1857.

Baldwin, D., Crane, V., Rice, D. (1999). A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. Curr. Opin. Plant Biol. **2,** 96-103.

Barcelo, J., Poschenrieder, C. (1990). Plant Water Relations as Affected by Heavy-Metal Stress - a Review. J. Plant Nutr. **13,** 1-37.

Baudouin, E., Meskiene, I., Hirt, H. (1999). Unsaturated fatty acids inhibit MP2C, a protein phosphatase 2C involved in the wound-induced MAP kinase pathway regulation. Plant J. **20,** 343-348.

Becraft, P.W. (2002). Receptor Kinase Signaling in Plant Development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **18,** 163-192.

Ben-Hayyim, G., Gueta-Dahan, Y., Avsian-Kretchmer, O., Weichert, H., Feussner, I. (2001). Preferential induction of a 9-lipoxygenase by salt in salt-tolerant cells of *Citrus sinensis* L. Osbeck. Planta **212,** 367-375.

Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., de Laguerie, P., Petit, D. (2002). Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? New Phytol. **155,** 47-57.

Bert, V., Macnair, M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D. (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri (*Brassicaceae). New Phytol. **146,** 225-233.

Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N. (2003). Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. Plant Soil **249,** 9-18.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7,** 1513-1523.

Bizily, S.P., Rugh, C.L., Meagher, R.B. (2000). Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. Nat. Biotechnol. **18,** 213-217.

Bizily, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O., Meagher, R.B. (1999). Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96,** 6808-6813.

Bloss, T., Clemens, S., Nies, D.H. (2002). Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. Planta **214,** 783-791.

Bogre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H., Heberle-Bors, E. (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. Plant Cell **11,** 101-113.

Bogre, L., Ligterink, W., Heberle-Bors, E., Hirt, H. (1996). Mechanosensors in plants. Nature **383,** 489-490.

Bogre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1997). Wounding Induces the Rapid and Transient Activation of a Specific MAP Kinase Pathway. Plant Cell **9,** 75-83.

Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, J.E., Kammer, P., Marin, E., Feller, U., Martinoia, E. (2003). Transcript levels of AtMRPs after cadmium treatment: induction of *AtMRP3*. Plant Cell Environ. **26,** 371-381.

Breyne, P., Dreesen, R., Cannoot, B., Rombaut, D., Vandepoele, K., Rombauts, S., Vanderhaeghen, R., Inze, D., Zabeau, M. (2003). Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. Mol. Genet. Genomics **269,** 173-179.

Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., Robinson, B.H. (1998). Phytomining. Trends Plant Sci. **3,** 359-362.

Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. (Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists).

Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J.T., Buchanan-Wollaston, V. (1998). Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. Plant J. **16,** 209-221.

Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. J. Biol. Chem. **275,** 36734-36740.

Carninci, P., Hayashizaki, Y. (1999). High-Efficiency Full-Length cDNA Cloning. Methods Enzymol. **303,** 19-44.

Carri, M.T., Galiazzo, F., Ciriolo, M.R., Rotilio, G. (1991). Evidence for co-regulation of Cu,Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in yeast through transcriptional control by copper via the ACE 1 factor. FEBS Lett. **278,** 263-266.

Chaney, R.L. (1988). Plants can utilize iron from Fe-N,N'-di-(2-hydroxybenzoly)-ethylenediamine-N-N'-diacetic acid, a ferric chelate with greater formation constant than Fe-EDDHA. J. Plant Nutr. **11,** 1033-1050.

Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J. (1997). Phytoremediation of soil metals. Curr. Opin. Biotechnol. **8,** 279-284.

Chardonnens, A.N., Koevoets, P.L., van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A. (1999). Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Physiol. **120,** 779-786.

Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., Mauch, F., Luan, S., Zou, G., Whitham, S.A., Budworth, P.R., Tao, Y., Xie, Z., Chen, X., Lam, S., Kreps, J.A., Harper, J.F., Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., Heinlein, M., Kobayashi, K., Hohn, T., Dangl, J.L., Wang, X., Zhu, T. (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. Plant Cell **14,** 559-574.

Chen, W.Q., Chao, G., Singh, K.B. (1996). The promoter of a H_2O_2-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. Plant J. **10,** 955-966.

Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C., Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. Plant Physiol. **129,** 469-485.

Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., Luan, S. (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **129**, 661-77.

Cheung, W.Y. (1988). Calmodulin and its activation by cadmium ion. Ann. N. Y. Acad. Sci. **522,** 74-87.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162,** 156-159.

Chuang, C.F., Running, M.P., Williams, R.W., Meyerowitz, E.M. (1999). The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev. **13,** 334-344.

Clark, G.B., Sessions, A., Eastburn, D.J., Roux, S.J. (2001). Differential expression of members of the annexin multigene family in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **126,** 1072-1084.

Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta **212,** 475-486.

Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I. (1998). The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 12043-12048.

Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D.H., zur Nieden, U. (2002b). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. J. Biol. Chem. **277,** 18215-18221.

Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. Embo J. **18,** 3325-3333.

Clemens, S., Palmgren, M.G., Kramer, U. (2002a). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci. **7,** 309-315.

Clemens, S., Schroeder, J.I., Degenkolb, T. (2001). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. Eur. J. Biochem. **268,** 3640-3643.

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **16,** 735-743.

Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. **53,** 159-182.

Cohen, P. (1989). The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. Annu. Rev. Biochem. **58,** 453-508.

Coleman, J.E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annu. Rev. Biochem. **61,** 897-946.

Conklin, D.S., McMaster, J.A., Culbertson, M.R., Kung, C. (1992). *Cot1*, a Gene Involved in Cobalt Accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. **12,** 3678-3688.

Connolly, E.L., Fett, J.P., Guerinot, M.L. (2002). Expression of the *IRT1* metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. Plant Cell **14,** 1347-1357.

Culotta, V.C., Klomp, L.W.J., Strain, J., Casareno, R.L.B., Krems, B., Gitlin, J.D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. J. Biol. Chem. **272,** 23469-23472.

Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R., Briat, J.F. (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. Biochem. J. **347,** 749-755.

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,** 346-349.

Czarneckaverner, E., Yuan, C.X., Fox, P.C., Gurley, W.B. (1995). Isolation and Characterization of 6 Heat-Shock Transcription Factor cDNA Clones from Soybean. Plant Mol. Biol. **29,** 37-51.

Dahmani-Müller, H., Van Oort, F., B., G., M., B. (2000). Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. Environ. Pollut. **109,** 231-238.

De Knecht, J.A., Van Baren, N., Ten Bookum, W.M., Wong Fong Sang, H.W., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C. (1995). Synthesis and degradation of phytochelatins in Cd-sensitive and Cd-tolerant *Silene vulgaris*. Plant Sci. **106,** 9-18.

De Vos, C.H.R., Schat, H., Dewaal, M.A.M., Vooijs, R., Ernst, W.H.O. (1991). Increased Resistance to Copper-Induced Damage of the Root Cell Plasmalemma in Copper Tolerant *Silene cucubalus*. Physiol. Plant. **82,** 523-528.

Debouck, D. (1995). Differential display or differential dismay. Curr. Opin. Biol. **6,** 597-599.

Desikan, R., Clarke, A., Atherfold, P., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1999b). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. Planta **210,** 97-103.

Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1999a). H_2O_2 activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. J. Exp. Bot. **50,** 1863-1866.

Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K., Neill, S.J. (2001). Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. Plant Physiol. **126,** 1579-1587.

Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., Neill, S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. Plant Physiol. **127,** 159-172.

Devetten, N.C., Ferl, R.J. (1995). Characterization of a Maize G-Box Binding-Factor That Is Induced by Hypoxia. Plant J. **7,** 589-601.

DeWald, D.B., Torabinejad, J., Jones, C.A., Shope, J.C., Cangelosi, A.R., Thompson, J.E., Prestwich, G.D., Hama, H. (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. Plant Physiol. **126,** 759-769.

Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D., Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **12,** 6025-6030.

Ditt, R.F., Nester, E.W., Comai, L. (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98,** 10954-10959.

Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 15665-15670.

Dreesen, T.D., Johnson, D.H., Henikoff, S. (1988). The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes. Mol. Cell Biol. **8,** 5206-5215.

Droillard, M., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., Lauriere, C. (2002). Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. FEBS Lett. **527,** 43-50.

Droillard, M.J., Thibivilliers, S., Cazale, A.C., Barbier-Brygoo, H., Lauriere, C. (2000). Protein kinases induced by osmotic stresses and elicitor molecules in tobacco cell suspensions: two crossroad MAP kinases and one osmoregulation-specific protein kinase. FEBS Lett. **474,** 217-222.

Dubos, C., Plomion, C. (2003). Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. Plant Mol. Biol. **51,** 249-262.

Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D. (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. Plant Cell **12,** 963-977.

Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L. (2002). Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). Planta **214,** 635-640.

Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93,** 5624-5628.

Elion, E.A. (1998). Routing MAP kinase cascades. Science **281,** 1625-1626.

Elion, E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. Curr. Opin. Microbiol. **3,** 573-581.

Elion, E.A. (2001). The Ste5p scaffold. J. Cell Sci. **114,** 3967-3978.

Enard, W., Khaitovich, P., Klose, J., Zollner, S., Heissig, F., Giavalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., Doxiadis, G.M., Bontrop, R.E., Paabo, S. (2002). Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. Science **296,** 340-343.

Ernst, W. (1974). Schwermetallvegetationen der Erde. (Stuttgart: G. Fischer Verlag).

Ernst, W.H.O., Joosse-van Damme, E.N.G. (1983). Umweltbelastungen durch Mineralstoffe - Biologische Effekte-. (VEB Gustav Fischer Verlag Jena).

Ewing, R.M., Kahla, A.B., Poirot, O., Lopez, F., Audic, S., Claverie, J.M. (1999). Large-scale statistical analysis of rice ESTs revealed correlated patterns of gene expression. Genome Res. **9,** 950-959.

Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry **10,** 2606-2616.

Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C.J., Hofmann, K., Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. Nucl. Acids Res. **30,** 235-238.

Fausto da Silva, J.J.R., Williams, R.J.P. (2001). The Biological Chemistry of the Elements. (Oxford University Press).

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) (Seattle: Depatment of Genetics University of Washington).

Fojtova, M., Kovarik, A. (2000). Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. Plant Cell Environ. **23,** 531-537.

Fox, T.C., Guerinot, M.L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **49,** 669-696.

Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y., Takahashi, Y. (2000). REPRESSION OF SHOOT GROWTH, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. Plant Cell **12,** 901-915.

Fukuda, T., Kido, A., Kajino, K., Tsutsumi, M., Miyauchi, Y., Tsujiuchi, T., Konishi, Y., Hino, O. (1999). Cloning of Differentially Expressed Genes in Highly and Low Metastatic Rat Osteosarcmas by a Modified cDNA-AFLP Method. Biochem. and Biophys. Res. Commun. **261,** 35-40.

Gamas, P., Niebel, F.d.C., Lescure, N., Cullimore, J. (1996). Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. Mol. Plant Microbe Interact. **9,** 233-242.

Garcia-Hernandez, M., Murphy, A., Taiz, L. (1998). Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **118,** 387-397.

Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. Biopolymers **47,** 479-491.

Gerke, V., Moss, S.E. (2002). Annexins: from structure to function. Physiol. Rev. **82,** 331-371.

Ghassemian, M., Waner, D., Tchieu, J., Gribskov, M., Schroeder, J. I. (2001). An integrated *Arabidopsis* annotation database for Affymetrix Genechip data analysis, and tools for regulatory motif searches. Trends Plant Sci. **6**, 448-449.

Giedroc, D.P., Chen, X., Apuy, J.L. (2001). Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation. Antioxid. Redox Signal. **3,** 577-596.

Girke, T., Todd, J., Ruuska, S., White, J., Benning, C., Ohlrogge, J. (2000). Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. Plant Physiol. **124,** 1570-1581.

Glerum, D.M., Shtanko, A., Tzagoloff, A. (1996). Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. J. Biol. Chem. **271,** 14504-14509.

Granger, C.L., Cyr, R.J. (2001). Characterization of the yeast copper-inducible promoter system in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. **20,** 227-234.

Grill, E., Loffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1989). Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, Are Synthesized from Glutathione by a Specific Gamma-Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86,** 6838-6842.

Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins - the Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher-Plants. Science **230,** 674-676.

Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., Eide, D. (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 7220-7224.

Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1465,** 190-198.

Ha, S.B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B., Cobbett, C.S. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Plant Cell **11,** 1153-1163.

Haag, E., Raman, V. (1994). Effects of primer choice and source of Taq DNA polymerase on the banding patterns of differential display RT-PCR. Biotechniques **2,** 226-228.

Habu, Y., Fukada-Tanaka, S., Hisatomi, Y., Iida, S. (1997). Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. **234,** 516-521.

Hamer, D.H. (1986). Metallothionein. Annu. Rev. Biochem. **55,** 913-951.

Hamer, D.H., Thiele, D.J., Lemontt, J.E. (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. Science **228,** 685-690.

Harada, E., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. J. Plant Physiol. **159,** 445-448.

Harres, H.P. (1999). Schwermetallgehalte in Böden, Pflanzen, Fließgewässern und Sedimenten unterschiedlicher belasteter Regionen Südsardiniens. In Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (Halle/S.: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

Hasegawa, M., Bressan, R., Pardo, J.M. (2000). The dawn of plant salt tolerance genetics. Trends Plant Sci. **5,** 317-319.

Heider, H., Boscheinen, O., Scharf, K.D. (1998). A heat-stress pulse inactivates a 50 kDa myelin basic protein kinase in tomato. Bot. Acta **111,** 398-401.

Heiss, S., Schafer, H.J., Haag-Kerwer, A., Rausch, T. (1999). Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. Plant Mol. Biol. **39,** 847-857.

Hell, R., Stephan, U.W. (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. Planta **216,** 541-551.

Henriques, R., Jasik, J., Klein, M., Martinoia, E., Feller, U., Schell, J., Pais, M.S., Koncz, C. (2002). Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene *IRT1* results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. Plant Mol. Biol. **50,** 587-597.

Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Penarrubia, L., Amasino, R.M. (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. Plant Physiol. **117,** 1227-1234.

Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A., Ecker, J.R. (1999). Responsive-to-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. Cell **97,** 383-393.

Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T., Shinozaki, K. (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92,** 3903-3907.

Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., Yodoi, J. (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. J. Biol. Chem. **274,** 27891-27897.

Hirschi, K.D. (1999). Expression of *Arabidopsis* CAX1 in tobacco: Altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. Plant Cell **11,** 2113-2122.

Hoffmann, R., Seidl, T., Dugas, M. (2002). Profound effect of normalization on detection of differentially expressed genes in oligonucleotide microarray data analysis. Genome Biol. **3,** 1-11.

Hofmann, A., Proust, J., Dorowski, A., Schantz, R., Huber, R. (2000). Annexin 24 from *Capsicum annuum*. X-ray structure and biochemical characterization. J. Biol. Chem. **275,** 8072-8082.

Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., Deng, X.W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. Genes Dev. **16,** 1247-1259.

Horvath, D.M., Chua, N.-H. (1996). Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. Plant Mol. Biol. **31,** 1061-1072.

Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S. (1995). Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. Plant Physiol. **107,** 1059-1066.

Huala, E., Dickerman, A.W., Garcia-Hernandez, M., Weems, D., Reiser, L., LaFond, F., Hanley, D., Kiphart, D., Zhuang, M., Huang, W., Mueller, L.A., Bhattacharyya, D., Bhaya, D., Sobral, B.W., Beavis, W., Meinke, D.W., Town, C.D., Somerville, C., Rhee, S.Y. (2001). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. Nucl. Acids Res. **29,** 102-105.

Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. Plant J. **24,** 655-665.

Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.E., Scheel, D., Klessig, D.F., Y., M., Mundy, J., Ohashi, Y., Walker, J.C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends Plant Sci. **7,** 301-308.

Izawa, T., Foster, R., Chua, N.H. (1993). Plant bZIP Protein-DNA Binding-Specificity. J. Mol. Biol. **230,** 1131-1144.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci. **7,** 106-111.

Johnson, L. N., O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. Curr. Opin. Struct. Biol. **6**, 762-769

Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hirt, H. (1996). Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93,** 11274-11279.

Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., Hirt, H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. Curr. Opin. Plant Biol. **5,** 415-424.

Kadyrzhanova, D.K., Vlachonasios, K.E., Ververidis, P., Dilley, D.R. (1998). Molecular cloning of a novel heat induced/ chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display. Plant Mol. Biol. **36,** 885-895.

Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., Kimura, A. (1989). Identification of a Gene Conferring Resistance to Zinc and Cadmium Ions in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **219,** 161-167.

Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inze, D., Vanmontagu, M. (1995). Molecular Characterization of a Putative *Arabidopsis thaliana* Copper Transporter and Its Yeast Homolog. J. Biol. Chem. **270,** 28479-28486.

Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y., Kim, S.Y. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. Plant Cell **14,** 343-357.

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat. Biotechnol.**17,** 287-291.

Kemmerling, B. (2001). Identifizierung, Charakterisierung systemisch responsiver Gene der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) nach Inokulation mit dem nichtpathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae pv. maculicola*. (Halle/S.: Martin-Luther-Universität).

Kerk, D., Bulgrien, J., Smith, D.W., Barsam, B., Veretnik, S., Gribskov, M. (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. Plant Physiol. **129,** 908-925.

Kerr, I.D. (2002). Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. Biochim. Biophys. Acta **1561,** 47-64.

Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R. (1993). Ctr1, a Negative Regulator of the Ethylene Response Pathway in *Arabidopsis*, Encodes a Member of the Raf Family of Protein- Kinases. Cell **72,** 427-441.

Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklof, S., Till, S., Bogre, L., Hirt, H., Meskiene, I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. Plant Cell **12,** 2247-2258.

Kim, H.S., Delaney, T.P. (2002). Over-expression of *TGA5*, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. Plant J. **32,** 151-163.

Kim, J.C., Lee, S.H., Cheong, Y.H., Yoo, C.M., Lee, S.I., Chun, H.J., Yun, D.J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Lim, C.O., Cho, M.J. (2001). A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. Plant J. **25,** 247-259.

Kistner, C. (1999). Isolierung und Charakterisierung eines nach Infektion mit *Pseudomonas syringae pv. maculicola* systemisch responsiven Gens von *Solanum tuberosum* L. (Halle/S.: Martin-Luther-Universität).

Knetsch, M.L.W., Wang, M., Snaar-Jagalska, B.E., Heimovaara-Dijkstra, S. (1996). Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. Plant Cell **8,** 1061-1067.

Knight, H. (2000). Calcium signaling during abiotic stress in plants. Int. Rev. Cytol. **195,** 269-324.

Koch, M., Bishop, J., Mitchell-Olds, T. (1999). Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*. Plant Biol. **1,** 529-537.

Koch, M.A., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. (2000). Comparative Evolutionary Analysis of Chalcone Synthase ans Alcohol Dehydrogenase Loci in *Arabidopsis*, *Arabis*, and Related Genera (*Brassicaceae*). Mol. Biol. Evol. **17,** 1483-1498.

Koch, M.A., Weisshaar, B., Kroymann, J., Haubold, B., Mitchell-Olds, T. (2001). Comparative Genomics and Regulatory Evolution: Conservation and Function of the *Chs* and *Apetala3* Promoters. Mol. Biol. Evol. **18,** 1882-1891.

Koga, M., Zwaal, R., Guan, K.L., Avery, L., Ohshima, Y. (2000). A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. Embo J. **19,** 5148-5156.

Koncz, C., Schell, J. (1986). The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol. Gen. Genet. **204,** 383-396.

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 Mol. Biol. **40,** 37-44.

Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97,** 2940-2945.

Krämer, U., Cotter Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. Nature **379,** 635-638.

Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I., Salt, D.E. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. Plant Physiol. **122,** 1343-1353.

Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. Plant Physiol. **130,** 2129-2141.

Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J., Scheel, D. (2003). Mitogen-activated Protein Kinases Play an Essential Role in Oxidative Burst-independent Expression of Pathogenesis-related Genes in Parsley. J. Biol. Chem. **278,** 2256-2264.

Krupa, Z. (1988). Cadmium-Induced Changes in the Composition and Structure of the Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex-II in Radish Cotyledons. Physiol. Plant. **73,** 518-524.

Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R. (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. Plant Cell **11,** 2283-2290.

Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P. (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. Planta **212,** 75-84.

Kusano, T., Berberich, T., Harada, M., Suzuki, N., Sugawara, K. (1995). A Maize DNA-Binding Factor with a bZIP Motif Is Induced by Low-Temperature. Mol. Gen. Genet. **248,** 507-517.

Kyte, J., Dolittle, F.R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. **157,** 693-698.

Labbe, S., Zhu, Z., Thiele, D.J. (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. J. Biol. Chem. **272,** 15951-15958.

Laity, J.H., Lee, B.M., Wright, P.E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. Curr. Opin. Struct. Biol. **11,** 39-46.

Lane, B., Kajioka, R., Kennedy, T. (1987). The Wheat-Germ-Ec Protein Is a Zinc-Containing Metallothionein. Biochem. Cell Biol. **65,** 1001-1005.

Lane, T.W., Morel, F.M.M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97,** 4627-4631.

Larsson, E.H., Bornman, J.F., Asp, H. (1998). Influence of UV-B radiation and Cd^{2+} on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. J. Exp. Bot. **49,** 1031-1039.

Lasat, M.M., Baker, A., Kochian, L.V. (1996). Physiological Characterization of Root Zn^{2+} Absorption and Translocation to Shoots in Zn Hyperaccumulator and Nonaccumulator Species of *Thlaspi*. Plant Physiol. **112,** 1715-1722.

Lasat, M.M., Baker, A.J., Kochian, L.V. (1998). Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. Plant Physiol. **118,** 875-883.

Lee, B.N., Elion, E.A. (1999). The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96,** 12679-12684.

Lee, J., Klessig, D.F., Nürnberger, T. (2001). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. Plant Cell **13,** 1079-1093.

Lee, S., Korban, S.S. (2002). Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (*AtPCS1*) by cadmium during early stages of plant development. Planta **215,** 689-693.

Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Sang, K.H., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G., Harn, C.H. (2002). PPI1: A novel pathogen-induced basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factor from pepper. Mol. Plant Microbe Interac. **15,** 540-548.

Lemaire, S., Keryer, E., Stein, M., Schepens, I.I., Issakidis-Bourguet, E., Grard-Hirne, C., Miginiac-Maslow, M., Jacquot, J.P. (1999). Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **120,** 773-778.

Lescot, M., Dehais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouze, P., Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucl. Acids Res. **30,** 325-327.

Leung, J., Bouvierdurand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chefdor, F., Giraudat, J. (1994). *Arabidopsis* ABA Response Gene ABI1 - Features of a Calcium- Modulated Protein Phosphatase. Science **264,** 1448-1452.

Leung, J., Merlot, S., Giraudat, J. (1997). The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. Plant Cell **9,** 759-771.

Li, H.Y., Gray, J.E. (1997). Pollination-enhanced expression of a receptor-like protein kinase related gene in tabacco styles. Plant Mol. Biol. **33,** 653-665.

Li, L.G., He, Z.Y., Pandey, G.K., Tsuchiya, T., Luan, S. (2002). Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. J. Biol. Chem. **277,** 5360-5368.

Li, L.G., Tutone, A.F., Drummond, R.S.M., Gardner, R.C., Luan, S. (2001). A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. Plant Cell **13,** 2761-2775.

Li, L.T., Kaplan, J. (1998). Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. J. Biol. Chem. **273,** 22181-22187.

Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele, D.J., Rea, P.A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94,** 42-47.

Liang, P., Pardee, A.B. (1992). Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science **257,** 967-971.

Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. (1983). Determination of the total carotinoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochem. Soc. Transac. **603,** 591-592.

Lin, S.J., Culotta, V.C. (1995). The *Atx1* Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Small Metal Homeostasis Factor That Protects Cells against Reactive Oxygen- Toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92,** 3784-3788.

Liu, L.S., White, M.J., MacRae, T.H. (1999). Transcription factors and their genes in higher plants - Functional domains, evolution and regulation. Eur. J. Biochem. **262,** 247-257.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell **10,** 1391-1406.

Lopez-Molina, L., Chua, N.H. (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **41,** 541-547.

Luan, S. (2003). Protein Phosphatases in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. **54**, 63-92

Lyons, T.J., Gasch, A.P., Gaither, L.A., Botstein, D., Brown, P.O., Eide, D.J. (2000). Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97,** 7957-7962.

Macnair, M.R. (2002). Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. New Phytol. **155,** 59-66.

Macnair, M.R., Bert, V., Huitson, S.B., Saumitou-Laprade, P., Petit, D. (1999). Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. Proc. R. Soc. Lond. B **266,** 2175-2179.

Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. (London: Academic Press).

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell **80,** 179-185.

Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B., Schulz, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters-more than just detoxifiers. Planta **214,** 345-355.

Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1994). Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91,** 584-588.

Matsumura, H., Nirasawa, S., Terauchi, R. (1999). Transcript profiling in rice (*Oryza sativa*, L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). Plant J. **20,** 719-726.

Matz, M.V., Lukyanov, S.A. (1998). Differential strategies of differential display: areas of application. Nulc. Acids Res. **26,** 5537-5543.

Mench, M., Morel, J.L., Guckert, A., Guillet, B. (1988). Metal-Binding with Root Exudates of Low-Molecular Weight. J. Soil. Sci. **39,** 521-527.

Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. Plant J. **25,** 295-303.

Meskiene, I., Bögre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstötter, M., Zwerger, K., Ammerer, G., Hirt, H. (1998). MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 1938-1943.

Mikami, K., Katsura, M., Ito, T., Okada, K., Shimura, Y., Iwabuchi, M. (1995). Developmental and Tissue-Specific Regulation of the Gene for the Wheat Basic/Leucine Zipper Protein Hbp-1a(17) in Transgenic *Arabidopsis* Plants. Mol. Gen. Genet. **248,** 573-582.

Mira, H., Martinez-Garcia, F., Penarrubia, L. (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. Plant J. **25,** 521-528.

Miyashita, N.T., Innan, H., Terauchi, R. (1996). Intra- and Interspecific Variation of the Alcohol Dehydrogenase Locus Region in Wild Plants *Arabis gemmifera* and *Arabidopsis thaliana*. Mol. Biol. Evol. **13,** 433-436.

Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., Shinozaki, K. (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93,** 765-769.

Mohr, K. (1978). Geologie und Minerallagerstätten des Harzes. (Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung).

Mouaheb, N., Thomas, D., Verdoucq, L., Monfort, P., Meyer, Y. (1998). In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 3312-3317.

Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. (1998). Phospholipid signalling in plants. Biochim. Biophys. Acta **1389,** 222-272.

Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I.I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. Plant J. **20,** 381-388.

Murata, N., Los, D.A. (1997). Membrane Fluidity and Temperature Perception. Plant Physiol. **115,** 875-879.

Murphy, A., Taiz, L. (1995). Comparison of Metallothionein Gene-Expression and Nonprotein Thiols in 10 *Arabidopsis* Ecotypes - Correlation with Copper Tolerance. Plant Physiol. **109,** 945-954.

Murphy, A., Taiz, L. (1997). Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 *Arabidopsis* ecotypes. New Phytol. **136,** 211-222.

Nakai, K., Horton, P. (1999). PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends Biochem. Sci. **24,** 34-36.

Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. Plant Mol. Biol. **42,** 657-665.

Negishi, T., Nakanishi, H., Yazaki, J., Kishimoto, N., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kikuchi, S., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2002). cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. Plant J. **30,** 83-94.

Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J. Exp. Bot. **53,** 1237-1247.

Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L. (1994). Heat-Shock Proteins Induce Heavy-Metal Tolerance in Higher- Plants. Planta **194,** 360-367.

Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol. **51,** 730-750.

Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., Gatz, C. (2000). Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. J. Biol. Chem. **275,** 19897-19905.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. J. Exp. Bot. **53,** 1283-1304.

Noel, L.F., Thieme, D., Nennstiel, D., Bonas, U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. **41,** 1271-1281.

Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.D. (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? Cell Stress Chaperones **6,** 177-189.

Nuhse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., Boller, T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. J. Biol. Chem. **275,** 7521-7526.

O´Kane, S.L., Al-Shehbaz, I.A. (1997). A Synopsis of *Arabidopsis* (Brassicaceae). Novon **7**, 323-327.

Olmos, E., Martinez-Solano, J.R., Piqueras, A., Hellin, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). J. Exp. Bot. **54,** 291-301.

O'Rourke, S.M., Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. **12,** 2874-2886.

Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G., Ow, D.W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. Embo J. **11,** 3491-3499.

Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.T., Ow, D.W. (1995). Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeats ABC-type Vacuolar Membrane Protein. J. Biol. Chem. **270,** 4721-4728.

Ouariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherif, A., Ghorbal, M.H. (1997). Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. Phytochemistry **45,** 1343-1350.

Outten, C.E., O'Halloran, T.V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. Science **292,** 2488-2492.

Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997). The *Arabidopsis HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. Genes Dev. **11,** 2983-2995.

Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. Nature **373**, 573-580.

Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97,** 4956-4960.

Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. Plant J. **32,** 539-548.

Persans, M.W., Yan, X.G., Patnoe, J., Krämer, U., Salt, D.E. (1999). Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense* (Halacsy). Plant Physiol. **121,** 1117-1126.

Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., Mundy, J. (2000). *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell **103,** 1111-1120.

Petters, J. (2001). Isolierung und Charakterisierung pathogen- und stress-induzierter Gene von Kartoffel *Solanum tuberosum* L. (Halle/S.: Martin-Luther-Universität).

Petters, J., Göbel, C., Scheel, D., Rosahl, S. (2002). A Pathogen-Responsive cDNA from Potato Encodes a Protein with Homology to a Phosphate Starvation-Induced Phosphatase. Plant Cell Physiol. **43,** 1049-1053.

Pich, A., Scholz, G. (1996). Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill): Nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. J. Exp. Bot. **47,** 41-47.

Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., Knight, M.R. (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. Plant J. **18,** 491-497.

Qin, L., Overmars, H., Helder, J., Popeijus, H., van der Voort, J.R., Groenink, W., van Koert, P., Schots, A., Bakker, J., Smant, G. (2000). An Efficient cDNA-AFLP-Based Strategy for the Identification of Putative Pathogenicity Factors form Potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis*. Mol. Plant Microbe Interact. **13**, 830-836.

Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., O'Halloran, T.V. (1999). Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. Science **284,** 805-808.

Rauser, W.E. (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants - The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. Cell Biochem. Biophys. **31,** 19-48.

Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Séraphin, B. (1999). A generic proteinpurification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat. Biotechnol. **17,** 1030-1032.

Roberts, R.L., Fink, G.R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes Dev. **8,** 2974-2985.

Robinson, N.J., Wilson, J.R., Turner, J.S. (1996). Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn^{2+}-metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: Putative role for MT2 in Zn^{2+} metabolism. Plant Mol. Biol. **30,** 1169-1179.

Rodriguez, F.I., Esch, J.J., Hall, A.E., Binder, B.M., Schaller, G.E., Bleecker, A.B. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. Science **283,** 996-998.

Rodriguez, P.L. (1998). Protein phosphatases 2C (PP2C) function in higher plants. Plant Mol. Biol. **38,** 919-927.

Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. Plant Cell **11,** 273-287.

Romera, F.J., Alcantara, E. (1994). Iron-Deficiency Stress Responses in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Roots (A Possible Role for Ethylene?). Plant Physiol. **105,** 1133-1138.

Sablowski, R.W.M., Meyerowitz, E.M. (1998). A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes PETELA3/PISTILLATA. Cell **92,** 93-103.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology **177,** 67-80.

Salt, D.E., Rauser, W.E. (1995). MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots. Plant Physiol. **107,** 1293-1301.

Samaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bogre, L., Baluska, F., Hirt, H. (2003). Involvement of MAP kinase SIMK and actin cytoskeleton in the regulation of root hair tip growth. Cell Biol. Int. **27,** 257-259.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Labotory Manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Samuel, M.A., Ellis, B.E. (2002). Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. Plant Cell **14,** 2059-2069.

Sancenon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J., Penarrubia, L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. **51,** 577-587.

Sanchez-Fernandez, R., Emyr Davies, T.G., Coleman, J.O.D., Rea, P.A. (2001). The *Arabidopsis thailana* ABC Protein Superfamily, a complete Inventory. J. Biol. Chem. **276,** 30231-30244.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulsen, A.R. (1977). DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74,** 5463-5467.

Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R.S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. Plant J. **31,** 629-638.

Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. Environ. Exp. Bot. **41,** 105-130.

Sano, T., Nagata, T. (2002). The possible involvement of a phosphate-induced transcription factor encoded by phi-2 gene from tobacco in ABA-signaling pathways. Plant Cell Physiol. **43,** 12-20.

Sargent, T.D. (1987). Isolation of differentially expressed genes. Meth. Enzymol. **152,** 423-432.

Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann, J.L., Traverse, A.S., Marcus, M.A., Manceau, A. (2002). Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. Plant Physiol. **130,** 1815-1826.

Schaaf, G., Catoni, E., Fitz, M., Schwacke, R., Schneider, A., von Wiren, N., Frommer, W.B. (2002). A putative role for the vacuolar calcium/manganese proton antiporter AtCAX2 in heavy metal detoxification. Plant Biol. **4,** 612-618.

Schaeffer, H.J., Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. Mol. Cell Biol. **19,** 2435-2444.

Schat, H., Liugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. J. Exp. Bot. **53,** 2381-2392.

Schellenberger, A. (1989). Enzymkatalyse. (VEB Gustav Fischer Verlag Jena).

Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W., Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91,** 1672-1676.

Schützendübel, A., Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. Exp. Bot. **53,** 1351-1365.

Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J. **31,** 279-292.

Seo, S., Sano, H., Ohashi, Y. (1999). Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. Plant Cell **11,** 289-298.

Shah, K., Dubey, R.S. (1995). Effect of Cadmium on RNA Level as Well as Activity and Molecular-Forms of Ribonuclease in Growing Rice Seedlings. Plant Physiol. Biochem **33,** 577-584.

Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B.P., Mitra, B. (2000). The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb (II) /Cd (II) /Zn(II) -translocating ATPase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **275,** 3873-3878.

Sharma, Y.K., Davis, R.K. (1995). Isolation of a novel *Arabidopsis* ozone-induced cDNA by differential display. Plant Mol. Biol. **29,** 91-98.

Siberil, Y., Doireau, P., Gantet, P. (2001). Plant bZIP G-box binding factors - Modular structure and activation mechanisms. Eur. J. Biochem. **268,** 5655-5666.

Siedlecka, A., Baszynski, T. (1993). Inhibition of Electron Flow around Photosystem-I in Chloroplasts of Cd-Treated Maize Plants Is Due to Cd-Induced Iron-Deficiency. Physiol. Plant. **87,** 199-202.

Simones-Araujo, J.L., Rodrigues, R.L., de A. Gerhartd, L.B., Mondego, J.M.C., Alves-Ferreira, M., Rumjanek, N.G., Margis-Pinheiro, M. (2002). Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. FEBS Lett. **25875,** 1-7.

Solioz, M., Vulpe, C. (1996). CPx-type ATPases: A class of p-type ATPases that pump heavy metals. Trends Biochem.Sci. **21,** 237-241.

Stankovic, B., Vian, A., Henry-Vian, C., Davies, E. (2000). Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systemically wound-inducible bZIP DNA-binding protein. Planta **212,** 60-66.

Staxen, I.I., Pical, C., Montgomery, L.T., Gray, J.E., Hetherington, A.M., McAinsh, M.R. (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96,** 1779-1784.

Steffen, W., Linck, R.W. (1989). Multiple immunoblot:a sensitive technique to stain proteins and detect multiple antigens on a single two-dimensional replica. Electrophoresis **10,** 714-718.

Stephan, U.W., Schmidke, I., Pich, A. (1994). Phloem Translocation of Fe, Cu, Mn, and Zn in Ricinus Seedlings in Relation to the Concentrations of Nicotianamine, an Endogenous Chelator of Divalent Metal-Ions, in Different Seedling Parts. Plant Soil **165,** 181-188.

Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal-Ions. Free Radic. Biol. Med. **18,** 321-336.

Strathmann, A., Kuhlmann, M., Heinekamp, T., Droge-Laser, W. (2001). BZI-1 specifically heterodimerises with the tobacco bZIP transcription factors BZI-2, BZI-3/TBZF and BZI-4, and is functionally involved in flower development. Plant J. **28,** 397-408.

Sun, Y., Hegamyer, G., Colburn, N.H. (1994). Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. Cancer Res. **5,** 1139-1144.

Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Bouchez, D., Fromm, H. (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis CNGC1* gene confer Pb^{2+} tolerance. Plant J. **24,** 533-542.

Sussman, M.R., Amasino, R.M., Young, C.J., Krysan, P.J., Austin-Phillpis, S. (2000). The *Arabidopsis* knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. Plant Physiol. **124,** 1465-1467.

Suzuki, K., Shinshi, H. (1995). Transient Activation and Tyrosine Phosphorylation of a Protein-Kinase in Tobacco Cells Treated with a Fungal Elicitor. Plant Cell **7,** 639-647.

Suzuki, N., Koizumi, N., Sano, H. (2001). Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. **24,** 1177-1188.

Suzuki, N., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. (2002). Functional characterization of a heavy metal binding protein CdI19 from *Arabidopsis*. Plant J. **32,** 165-173.

Tabata, K., Kashiwagi, S., Mori, H., Ueguchi, C., Mizuno, T. (1997). Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. Biochim. Biophys. Acta **1326,** 1-6.

Tähtiharju, S., Palva, T. (2001). Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana.* Plant J. **26,** 461-470.

Taiz, L., Zeiger, E. (1999). Physiologie der Pflanzen. (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin).

Takagi, M., Satofuka, H., Amano, S., Mizuno, H., Eguchi, Y., Hirata, K., Miyamoto, K., Fukui, K., Imanaka, T. (2002). Cellular toxicity of cadmium ions and their detoxification by heavy metal-specific plant peptides, phytochelatins, expressed in Mammalian cells. J. Biochem. (Tokyo) **131,** 233-239.

Takahashi, K., Isobe, M., Knight, M.R., Trewavas, A.J., Muto, S. (1997). Hypoosmotic Shock Induces Increases in Cytosolic Ca^{2+} in Tobacco Suspension-Culture Cells. Plant Physiol. **113,** 587-594.

Tena, G., Renaudin, J.P. (1998). Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco cells. Plant J. **16,** 173-182.

The Arabidopsis Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature **408,** 796-815.

Thiele, D.J. (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. Mol. Cell Biol. **8,** 2745-2752.

Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T., and Buckhout, T.J. (2001). Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. Plant Physiol. **127,** 1030-1043.

Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97,** 4991-4996.

Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hortensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., Martinoia, E. (1998). An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. Plant J. **13,** 773-780.

Töpfer, R., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1987). Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. Nucl. Acids Res. **16,** 8725.

Trezzini, G.F., Horrichs, A., Somssich, I.E. (1993). Isolation of putative defense-related genes from *Arabidopsis thaliana* and expression in fungal elicitor-treated cells. Plant Mol. Biol. **2,** 385-389.

Tron, A.E., Bertoncini, C.W., Chan, R.L., Gonzalez, D.H. (2002). Redox regulation of plant homeodomain transcription factors. J. Biol. Chem. **277,** 34800-34807.

Ulm, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Peck, S.C., Zhu, T., Wang, X., Shinozaki, K., Paszkowski, J. (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. Embo J. **21,** 6483-6493.

Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. Trends Plant Sci. **5,** 67-74.

Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishihama, R., Machida, Y. (1995). Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92,** 8660-8664.

Van Assche, F., Clijsters, H. (1986a). Inhibition of Photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by Treatment with Toxic Concentration of Zinc - Effect on Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase Oxygenase. J. Plant Physiol. **125,** 355-360.

Van Assche, F., Clijsters, H. (1986b). Inhibition of Photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by Treatment with Toxic Concentrations of Zinc - Effects on Electron- Transport and Photophosphorylation. Physiol. Plant **66,** 717-721.

van der Biezen, E.A., Juwana, H., Parker, J.E., Jones, J.D.G. (2000). cDNA-AFLP Display for the Isolation of *Peronospora parasitica* Genes Expressed During Infection in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant Microbe Interact. **13,** 895-898.

van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonnens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Hooykaas, P.J.J. (1999). Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. Plant Physiol. **119,** 1047-1055.

van Hoof, N., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O., Tervahauta, A.I. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. Plant Physiol. **126,** 1519-1526.

van Vliet, C., Anderson, C.R., Cobbett, C.S. (1995). Copper-sensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. **109,** 871-878.

Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F., Leister, D. (2002). The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. **31,** 589-599.

Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., Rea, P.A. (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. J. Biol. Chem. **276,** 20817-20820.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P.A. (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96,** 7110-7115.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. Science **5235,** 484-487.

Verkleij, J.A.C., Schat, H. (1990). Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects., A.J. Shaw, (CRC Press), 179-193.

Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briata, J.F., Curie, C. (2002). IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. Plant Cell **14,** 1223-1233.

Vidmar, J.J., Tagmount, A., Cathala, N., Touraine, B., Davidian, J.-C.E. (2000). Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. **475,** 65-69.

Villanueva, A., Lozano, J., Morales, A., Lin, X., Deng, X., Hengartner, M.O., Kolesnick, R.N. (2001). jkk-1 and mek-1 regulate body movement coordination and response to heavy metals through jnk-1 in *Caenorhabditis elegans*. Embo J. **20,** 5114-5128.

Vögeli-Lange, R., Wagner, G.J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tabacco leaves: implication of transport function for cadmium-binding peptides. Plant Physiol. **92,** 1086-1093.

von Wiren, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A., Hider, R.C. (1999). Nicotianamine chelates both Fe-III and Fe-II. Implications for metal transport in plants. Plant Physiol. **119,** 1107-1114.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. **23,** 4407-4414.

Vranova, E., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D., Van Camp, W. (2000). Oxidative stress, heat shock and drought differentially affect expression of a tobacco protein phosphatase 2C. J. Exp. Bot. **51,** 1763-1764.

Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., F., M. (2002). Probing the Diversity ot the *Atabidopsis* glutathinone S-Transferase Gene Family. Plant Mol. Biol. **49,** 515-532.

Wang, M.L., Belmonte, S., Kim, U., Dolan, M., Morris, J.W., Goodman, H.M. (1999). A cluster of ABA-regulated genes on *Arabidopsis thaliana* BAC TO7MO7. Genome Res. **9,** 325-333.

Weber, M., Harada, E., Vess, C., v. Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S. (in Druck). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. Plant J.

Weigel, D., Ahn, J.H., Blazquez, M.A., Borevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E.J., Neff, M.M., Nguyen, J.T., Sato, S., Wang, Z.Y., Xia, Y., Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Yanofsky, M.F., Chory, J. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **122,** 1003-1013.

Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., R., C., McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucl. Acids Res. **20,** 4965-4970.

White, J.A., Todd, J., Newman, T., Focks, N., Girke, T., de Ilarduya, O.M., Jaworski, J.G., Ohlrogge, J.B., Benning, C. (2000). A new set of *Arabidopsis* expressed sequence tags from developing seeds. The metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. Plant Physiol. **124,** 1582-1594.

White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C., Davies, J.M. (2002). Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. Biochim. Biophys. Acta **1564,** 299-309.

Whiting, S.N., De Souza, M.P., Terry, N. (2001). Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. Environ. Sci. Technol. **35,** 3144-3150.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three- kinase module from yeast to human. Physiol. Rev. **79,** 143-180.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D., Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defense in C3 plants. Embo J. **16,** 4806-4816.

Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L. (2000). Emerging mechanism for heavy metal transport in plants. Biochim. Biophys. Acta **1465,** 104-126.

Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E. (1997). A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. Plant Cell **9,** 2093-2100.

Wintz, H., Vulpe, C. (2002). Plant copper chaperones. Biochem. Soc. Trans. **30,** 732-735.

Winzeler, E.A., Schena, M., Davis, R.W. (1999). Fluorescence-Based Expression Monitoring Using Microarrays. Meth. Enzymol. **306,** 3-18.

Woeste, K.E., Kieber, J.J. (2000). A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. Plant Cell **12,** 443-455.

Wollgiehn, R., Neumann, D. (1995). Stress-Response of Tomato Cell-Cultures to Toxic Metals and Heat-Shock - Differences and Similarities. J. Plant Physiol. **146,** 736-742.

Wortman, J.R., Haas, B.J., Hannick, L.I., Smith, R.K., Jr., Maiti, R., Ronning, C.M., Chan, A.P., Yu, C., Ayele, M., Whitelaw, C.A., White, O.R., Town, C.D. (2003). Annotation of the *Arabidopsis* genome. Plant Physiol. **132,** 461-468.

Wu, A., Wemmie, J.A., Edgington, N.P., Goebl, M., Guevara, J.L., Moye-Rowley, W.S. (1993). Yeast bZIP Proetins Mediate Pleiotropic Drug and Metal Resistance. J. Biol. Chem. **268,** 18850-18858.

Wu, Z., Liang, F., Hong, B., Young, J.C., Sussman, M.R., Harper, J.F., Sze, H. (2002). An endoplasmic reticulum-bound Ca^{2+}/Mn^{2+} pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn^{2+} stress. Plant Physiol. **130,** 128-137.

Xiang, C., Oliver, D.J. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. Plant Cell **10,** 1539-1550.

Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K., Oliver, D.J. (1999). A mini binary vector series for plant transformation. Plant Mol. Biol. **40,** 711-717.

Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell **14 Suppl,** S165-183.

Yablonski, D., Marbach, I., Levitzki, A. (1996). Dimerization of Ste5, a mitogen-activated protein kinase cascade scaffold protein, is required for signal transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93,** 13864-13869.

Yamaguchi-Iwai, Y., Dancis, A., Klausner, R.D. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. Embo J. **14,** 1231-1239.

Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **277,** 18914-18918.

Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell **6,** 251-264.

Yang, K.Y., Liu, Y.D., Zhang, S.Q. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98,** 741-746.

Zenk, M.H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants - A review. Gene **179,** 21-30.

Zettl, R., Schell, J., Palme, K. (1994). Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-3H]indole-3-acetic acid: identification of a glutathione S-transferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91,** 689-693.

Zhang, B., Foley, R.C., Singh, K.B. (1993). Isolation and Characterization of 2 Related *Arabidopsis* Ocs-Element bZIP Binding-Proteins. Plant J. **4,** 711-716.

Zhang, F., Romheld, V., Marschner, H. (1989). Effect of Zinc-Deficiency in Wheat on the Release of Zinc and Iron Mobilizing Root Exudates. Zeitung für Pflanzen- und Bodenkunde **152,** 205-210.

Zhang, S., Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. Plant Cell **9,** 809-824.

Zhang, S., Klessig, D.F. (1998a). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 7225-7230.

Zhang, S., Klessig, D.F. (1998b). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95,** 7433-7438.

Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T., McGrath, S.P. (2000). Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. Plant Cell Environ. **23,** 507-514.

Zhao, H., Eide, D.J. (1997). Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. **17,** 5044-5052.

Zhou, J.M., Goldsbrough, P.B. (1994). Functional Homologs of Fungal Metallothionein Genes from *Arabidopsis*. Plant Cell **6,** 875-884.

Zhu, H.N., Shipp, E., Sanchez, R.J., Liba, A., Stine, J.E., Hart, P.J., Gralla, E.B., Nersissian, A.M., Valentine, J.S. (2000). Cobalt binding to human and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: Implications for the metal ion transfer mechanism. Biochemistry **39,** 5413-5421.

Zhu, J.K. (2001). Plant salt tolerance. Trends Plant Sci. **6,** 66-71.

Zhu, T., Budworth, P., B., H., Brown, D., Chang, H.-S., Zou, G., Wang, X. (2001). Toward elucidating the global gene expression patterns of developing *Arabidopsis*: Parallel analysis of 8300 genes by a high-density oligonucleotide probe array. Plant Physiol. Biochem. **39,** 221-242.

1. Primer für RT-PCR-Analyse

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Temperatur	Zyklenzahl
Kin7-f01	gat aat cac ggg tgc tgg	56°C	25
Kin7-r01	gtt gat caa ctg tct acc	56°C	25
MPK4-f01	cgg aga gtt gtt tcg gaa gct c	58°C	30
MPK4-f02	atc tcc tga tga ctc aag ctt g	58°C	30
MPK4-r01	caa ggg ctc tcg tgt cat tg	58°C	30
MPK4-r02	tca cac tga gtc ttg agg att g	58°C	30
MPK11-f01	atg tca ata gag aaa cca ttc ttc	58°C	30
MPK11-f02	caa tgt cat tgc cat tat aga c	58°C	30
MPK11-r01	agg tgg tct tat tat gtc tat aat g	58°C	30
MPK11-r02	gca gca aat caa cag cat tga	58°C	30
PP2C-F02	gag gag tta aag cgg ctg	51°C	26
PP2C-R01	ggt aaa ggg atc aac atc	51°C	26
bZIP-F01	cat tat gat gtc tac tgt acc	51°C	34
bZIP-R01	gat tga tga tca atg atg c	51°C	34
78-1-f01	gag ctt tga ctt tag atc c	51°C	25
78-1-r01	gta cta ctt aga cat cac g	51°C	25
bTUB-s	gct tac gaa tcc gag ggt gcc	51°C-58°C	23
b-TUB-as	gtc cag tgt ctg tga tat tgc acc	51°C-58°C	23
GST6-5'	ccc cgt cga tat gag agc	56°C	23
GST6-3'	gag aga ggg tca cta ctg ctt c	56°C	23
at2g40180-f1	gat atc gaa agg cga gct tgc	58°C	29
at2g40180-r1	ctc tct taa ccg ata gct cag c	58°C	29
at3g27140-f1	gtt gat atg ttt cac gtt gtg g	58°C	29
at3g27140-r1	cactga tat cat caa acg agc	58°C	29

2. Allgemeine Klonierungsprimer

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Temperatur	Zyklenzahl
SP6	cga ttt agg tga cac tat ag	56°C	30
T7	taa tac gac tca cta tag gg	56°C	30
M13-for-AP	gct att acg cca gct ggc gaa agg ggg atg tg	70°C	30
M13-rev-AP	ccc cag gct tta cac ttt atg ctt ccg gca cg	70°C	30
M13-universal	tgt aaa acg acg gcc agt	56°C	30
M13-revers	agg gtt ttc cca gtc acg acg tt	56°C	30
oligo-dT-V	ttt ttt ttt ttt ttt ttt ttv	variabel	variabel

3. Primer zur Durchmusterung der T-DNA-Insertionslinien

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Temperatur	Zyklenzahl
BZIP-L	gta gga aga atc ttg cgg tct gtc tac tt	65°C	36
BZIP-R	ata gtg cca cat gac tca aaa gtc gtt at	65°C	36
PP2C-L	ctt ctc tct ctg tac atc gtc aca aca aa	65°C	36
PP2C-R	gtg aag cag ata aat cga caa gct tct ta	65°C	36
JL-202	cat ttt ata ata acg ctg cgg aca tct ac	65°C	36
Con-1B	ttt atc gaa gaa aca tgt cgt tga acc ag	65°C	36
Con-1°	cgt cta ggt ggt tca gta cct gtt gaa tg	65°C	36

4. Primer für die Amplifizierung der Makroarrayfragmente

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Temperatur	Zyklenzahl
GSH1-R01	aca gca gct ctt cga aca cgg	58°C	28
GSH1-F01	ttg act acc cac tcg atg tcc	58°C	28
GSH2-R01	act caa aaa cca gct gca acg	58°C	28
GSH2-F01	gct gtc aaa tgc ccg agc ata gc	58°C	28
GR1-R01	ctg atg atg cga tct tcg tgc	58°C	28
GR1-F01	tgg aca aca aag agg aca ttg c	58°C	28
MT2-R01	aac tgc gga tgt gga tct ggc t	58°C	28
MT2-F01	ttc tca ctt gca ggt gca agg atc ac	58°C	28
16S-AS	cgg taa ctc ttc tgg taa cga	54°C	25
16S-S	ggc gac tca acc agc tac tga	54°C	25
APR2-S	ctg aga tcc cta ttg ttc agg	54°C	30
APR2-AS	agt gaa tca aca tct cta tgc	54°C	30
AtMRP4-S	ctg gaa cgg tgt caa ctc aag gat gtt	54°C	30
AtMRP4-AS	att ccg gca gat cgg aga gcg tac tct t	54°C	30
AtMRP6-S	ggt cag aga caa ttg gtg tgc	54°C	25
AtMRP6-AS	acc ttg gtc tag gag cag gac	54°C	25
PDR8-AS	aga cgg tga aag cga tga gta	54°C	25
PDR8-S	caa caa gtc gct tcg att ttc	54°C	25
APX1-S	gta tcc aca ttg ctc tta gg	54°C	30
APX1-AS	gct cag aaa gct tca tgt gg	54°C	30
PRXCB-AS	cat cat gga gca gag agt tgg	54°C	30
PRXCB-S	tgg agg gtt cct ttg gga agg	54°C	30
GPX2-S	cca ggt tca aag ctg aat tcc	54°C	30
GPX2-AS	aga aga ggc ctg tcc caa cgc	54°C	30
MnSOD-S	gag cgc cat caa att caa cgg	54°C	30
MnSOD-AS	ctt ctc ata aac ctc gct tgc	54°C	30
CAT3-AS	cca gta aga ggt cca gat gcc	54°C	25
CAT3-S	ctt gat gtg acc aag atc tgg	54°C	25

5. RACE-Primer

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Temperatur	Zyklenzahl
RACE-MAPK-L	ggt ctg tcg gtt gta tac tcg gtg aaa c	70°C	25
RACE-MAPK-R	cag caa agt tct gtc tag ggt act gtg g	70°C	25
RACE-MAPK-R02	tct gtc tag ggt act gtg gaa gct gtc	70°C	25

6. Klonierungsprimer

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Temperatur	Zyklenzahl
bZIP-Xho-5	ccg ctc gag atg atg tct act gta ccg gcc	60°C	40
bZIP-BamH-3	cgc gga tcc tca aat cat atg atg atg att g	60°C	40
bZIP-wo3xHIS-BamH-3	cgc gga tcc tca att gat gat caa tga tgg att c	60°C	40

0-Extension-Primer:

5‘-ACT GGT CTC GAT GAC TGC GTA CCC GAT-3‘

Selektive Primer (Eu):

5‘-ATG AGT CCT GAC CGA NNN-3‘

Selektive Basen am 3‘-Ende:

Eu-1:	TAT-3‘	Eu-17:	CCA-3‘	Eu-33:	AGC-3‘	Eu-49:	AAA-3‘
Eu-2:	TTA-3‘	Eu-18:	CCT-3‘	Eu-34:	TGC-3‘	Eu-50:	AAT-3‘
Eu-3:	AAC-3‘	Eu-19:	CAC-3‘	Eu-35:	GGA-3‘	Eu-51:	ATA-3‘
Eu-4:	AAG-3‘	Eu-20:	CTC-3‘	Eu-36:	GGT-3‘	Eu-52:	ATT-3‘
Eu-5:	ACA-3‘	Eu-21:	ACC-3‘	Eu-37:	GAG-3‘	Eu-53:	TAA-3‘
Eu-6:	AGA-3‘	Eu-22:	TCC-3‘	Eu-38:	GTG-3‘	Eu-54:	TTT-3‘
Eu-7:	CAA-3‘	Eu-23:	CGA-3‘	Eu-39:	AGG-3‘	Eu-55:	TCA-3‘
Eu-8:	GAA-3‘	Eu-24:	CGT-3‘	Eu-40:	TGG-3‘	Eu-56:	TGA-3‘
Eu-9:	ATC-3‘	Eu-25:	CAG-3‘	Eu-41:	CCC-3‘	Eu-57:	CTA-3‘
Eu-10:	ATG-3‘	Eu-26:	CTG-3‘	Eu-42:	CCG-3‘	Eu-58:	GTA-3‘
Eu-11:	ACT-3‘	Eu-27:	ACG-3‘	Eu-43:	CGC-3‘	Eu-59:	TTC-3‘
Eu-12:	AGT-3‘	Eu-28:	TCG-3‘	Eu-44:	CGG-3‘	Eu-60:	TTG-3‘
Eu-13:	CAT-3‘	Eu-29:	GCA-3‘	Eu-45:	GCC-3‘	Eu-61:	TCT-3‘
Eu-14:	GAT-3‘	Eu-30:	GCT-3‘	Eu-46:	GCG-3‘	Eu-62:	TGT-3‘
Eu-15:	TAC-3‘	Eu-31:	GAC-3‘	Eu-47:	GGC-3‘	Eu-63:	CTT-3‘
Eu-16:	TAG-3‘	Eu-32:	GTC-3‘	Eu-48:	GGG-3‘	Eu-64:	GTT-3‘

ApoI Adapter:

```
5’- CTC GTA GAC TGC GTA CC
        CAT CTG ACG CAT GGT TAA-phosph-5’
```

TaqI Adapter:

```
5’-  GAC GAT GAG TCC TGA C
          TA CTC AGG ACT GGC-phosph-5’
```

ApoI+0 Primer:

CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT

TaqI+0 Primer:

GAC GAT GAG TCC TGA CCG A

Apo+2 Primer:

1. GAC TGC GTA CCA ATT TAA
2. GAC TGC GTA CCA ATT TAT
3. GAC TGC GTA CCA ATT TAG
4. GAC TGC GTA CCA ATT TAC
5. GAC TGC GTA CCA ATT TTA
6. GAC TGC GTA CCA ATT TTT
7. GAC TGC GTA CCA ATT TTG
8. GAC TGC GTA CCA ATT TTC
9. GAC TGC GTA CCA ATT TGA
10. GAC TGC GTA CCA ATT TGT
11. GAC TGC GTA CCA ATT TGG
12. GAC TGC GTA CCA ATT TGC
13. GAC TGC GTA CCA ATT TCA
14. GAC TGC GTA CCA ATT TCT
15. GAC TGC GTA CCA ATT TCG
16. GAC TGC GTA CCA ATT TCC

TaqI+2 Primer:

1. GAT GAG TCC TGA CCG AAA
2. GAT GAG TCC TGA CCG AAT
3. GAT GAG TCC TGA CCG AAG
4. GAT GAG TCC TGA CCG AAC
5. GAT GAG TCC TGA CCG ATA
6. GAT GAG TCC TGA CCG ATT
7. GAT GAG TCC TGA CCG ATG
8. GAT GAG TCC TGA CCG ATC
9. GAT GAG TCC TGA CCG AGA
10. GAT GAG TCC TGA CCG AGT
11. GAT GAG TCC TGA CCG AGG
12. GAT GAG TCC TGA CCG AGC
13. GAT GAG TCC TGA CCG ACA
14. GAT GAG TCC TGA CCG ACT
15. GAT GAG TCC TGA CCG ACG
16. GAT GAG TCC TGA CCG ACC

	AFLP-Klon	Länge	Identität zu *A. thalinana*		AGI Kode	Abgeleitete Funktion	Klassifizierung	Bemerkungen	ESTs
		[bp]	[%]	[bp/bp]					-
1	1,2	79	95	42/44	At4g02860	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		3
2	3,1	96	90	60/66	At2g46505	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		1
3	3,3	94	97	74/76	At1g72910	"disease resistance" Protein	Stressantwort		16
4	3,4	101	88	39/44	At3g63000	putatives Protein	Transport	Kern	16
5	4,1	148	95	99/104	At2g29460	putative Glutathion S-Transferase	Schwefel- und Glutathionstoffwechsel		-
6	4,1	23	100	17/17	At4g30290	Xyloglucan-Endo-1,4-beta-D-Glucanase	Stressantwort	Zellwandaufbau	11
7	4,2	111	92	82/89	At3g49420	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	4 TMD	2
8	5,1	33	100	18/18		Nicht kodierende Region	Nicht kodierende Region		-
9	5,4	153	92	82/89	At3g49680	Branched-chain-amino-acid Transaminase	Primärstoffwechsel	Chloroplast	12
10	6,1	171	95	79/83	At1g80870	Serin/Threonin Kinase	Signaltransduktion (Rezeptorkinasen)	Mitochondrium	3
11	6,3	115	90	38/42	At1g26910	putatives 60s ribosomales Protein L10	RNA Synthese		-
12	7,1	29	96	24/25	At2g30020	Protein Phosphatase 2C	Signaltransduktion	Chloroplast	1
13	7,2	23	100	17/17	At3g63310	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	7 TMD	-
14	7,3	39	91	34/37	At1g32050	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	4TMD	7
15	8,1	75	95	21/22	At3g09350	putatives Protein	Transport	Kern	-
16	8,2	25	96	24/25		ribosomales Protein S3	RNA Synthese	Chloroplast. gDNA	-
17	8,3	41	97	40/41	At2g24949	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		-
18	9,1	151	97	78/80	At4g34350	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	13
19	9,2	160	94	146/154	At3g06300	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	1 TMD	3
20	9,3	158	96	147/153		Nicht kodierende Region	Nicht kodierende Region		-
21	10,1	148	88	63/71	At1g01560	MAP Kinase 11 (AtMPK11)	Signaltransduktion		1
22	10,2	148	97	136/140	At5g07440	Glutamat Dehydrogenase 2	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	19
23	10,3	152	97	147/151	At4g34200	Phosphoglycerat-Dehydrogenase	Primärstoffwechsel	Chloroplast	18
24	11,1	116	92	121/131	At3g55090	ABC Transporter; AtWBC16	Transport	7 TMD	1
25	11,2	75	90	68/75	At2g22850	bZIP Transkriptions Faktor AtbZip6	Transkriptionskontrolle		-
26	12,1	128	90	115/127	At5g38420	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase Vorstufe	Photosynthese		179
27	12,2	137	88	96/108	At2g44460	putative Beta-Glucosidase	Stressantwort		-
28	13,2	114	100	18/18	At2g35120	Glycin Decarboxylase Komplex H-Protein	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	4
29	13,3	181	92	60/65	At4g33050	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		4
30	13,4	111	96	64/66	At2g44350	Citrat Synthase	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	18
31	14,1	157	87	85/97	At4g33050	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		4
32	14,3	97	91	64/70	At1g75560	DNA-bindendes Protein	Transkriptionskontrolle	Zn-Finger CCHC	-
33	14,4	96	90	78/86	At2g38580	putatives Kinesin	Stressantwort		-
34	15,2	59	96	57/59	At1g11930	putatives Prolin-Synthetase assoziirtes Protein	Primärstoffwechsel		-
35	16,2	144	94	85/90	At5g60750	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	4
36	16,3	151	87	137/157	At4g25630	Fibrillarin	Transkriptionskontrolle	mRNA-Splicing	11
37	17,1	116	97	113/116	At4g11570	putatives Protein	Primärstoffwechsel	P-Metabolismus	2
38	17,2	69	92	48/52	At5g26710	Glutamyl-tRNA Synthetase	RNA Synthese		10
39	18,1	97	100	32/32	At5g46250	putatives Protein	RNA Synthese		16
40	18,2	23	100	16/16		Pseudogen	Nicht kodierende Region		-

Nummer	AFLP-Klon	Länge	Identität zu *A. thalinana*		AGI Kode	Abgeleitete Funktion	Klassifizierung	Bemerkungen	ESTs
		[bp]	[%]	[bp/bp]					-
41	18,4	35				Keine Ähnlichkeit identifiziert	Nicht *A. thaliana*		-
42	19,1	96	92	39/42	At1g11930	putatives Prolin-Synthetase assoziirtes Protein	Primärstoffwechsel		-
43	19,3	56	97	54/55	At5g49550	Phytoen-Dehydrogenase	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	4
44	20,3	24	100	24/24	At4g16490	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	-
45	20,4	213	94	129/136	At2g33550	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		-
46	21,1	101	92	90/97	At4g37930	Glycin Hydroxymethyltransferase	Primärstoffwechsel	Chloroplast	58
47	21,3	336	97	42/43	At2g27020	20S Proteasom Untereinheit C8	Prioteinabbau		7
48	22,1	106	95	47/49	At4g34630	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		5
49	22,3	198	90	115/127	At5g38420	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase Vorstufe	Photosynthese	RuBisCO su 2b	179
50	23,1	42				Keine Ähnlichkeit identifiziert	Nicht *A. thaliana*		-
51	24,2	29	100	24/24	At1g30580	putatives GTP-bindendes Protein	Signaltransduktion		2
52	24,3	36	95	20/21	At2g17490	putatives Retroelement-pol-Polyprotein	Transkriptionskontrolle		-
53	24,4	33	100	17/17		putative Glucosyl-Transferase	Stressantwort		-
54	25,2	152	97	147/151	At4g34060	putatives Protein	DNA Rekombination, Reparatur		2
55	25,3	74	96	88/91	At3g01860	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		1
56	26,2	65				Keine Ähnlichkeit identifiziert	Nicht *A. thaliana*		-
57	26,3	77	96	28/29	At4g37280	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		-
58	28,2	240	88	119/134	At5g22650	Histon-Deacetylase	DNA Rekombination, Reparatur		15
59	31,3	58	94	47/50	At2g41430	Durch Dehydrierung ind. Protein (ERD15)	Stressantwort	Mitochondrium	45
60	31,4	103	96	97/101	At3g50930	Ähnlichkeit mit BCS1 Protein	Signaltransduktion		12
61	32,2	77	89	65/73	At5g46630	AP47/50p	Stressantwort		6
62	32,4	98	100	32/32	At5g46250	putatives Protein	RNA Synthese		16
63	33,1	97	91	64/70	At1g75560	DNA-bindendes Protein	Transkriptionskontrolle	Zn-Finger CCHC	-
64	37,3	132	96	29/30	At5g54680	putatives Protein	Transkriptionskontrolle	HLH-Domäne	19
65	38,3	97	96	31/32	At1g19870	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	3
66	38,4	393	94	37/39	At5g34850	“Purple acid” Phosphatase, AtPAP26	Signaltransduktion		13
67	39,3	89	96	59/61	At3g62720	Alpha-Glactosyltransferase	Stressantwort	Zellwandaufbau	2
68	40,1	65	87	57/65	At1g44575	Photosystem II 22kDa Protein	Photosynthese		-
69	40,2	71	95	68/71	At1g17170	putative Glutathion S-Transferase	Schwefel- und Glutathionstoffwechsel		1
70	41,1	56	100	17/17	At4g31590	putative Glucosyltransferase	Stressantwort	6 TMD	6
71	43,2	51	98	49/50	At5g58150	Rezeptor Kinase (AtKIN7)	Signaltransduktion (Rezeptorkinasen)	LRR1-	5
72	44,3	64	94	52/55	At3g04120	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	Primärstoffwechsel		107
73	44,4	159	91	43/47	At5g38410	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase Vorstufe	Photosynthese	RuBisCO ssu 3b	166
74	45,1	102	90	45/50	At4g37800	Endo-Xyloglucan Transferase	Stressantwort	Zellwandaufbau	4
75	45,3	154	98	152/154	At1g74270	putatives ribosomales Protein	RNA Synthese	Mitochondrium	3
76	46,1	146	94	106/112	At2g15870	putatives Retroelement-pol-Polyprotein	Transkriptionskontrolle	Chloroplast	-
77	46,2	106	90	97/107	At5g06330	Harpin-induzierbares Protei	Stressantwort	1 TMD	2
78	46,4	345	97	39/40	At5g56710	60S ribosomales Protein L31	Prioteinabbau		5
79	47,2	97	100	32/32	At5g46250	putatives Protein	RNA Synthese		16
80	48,1	74	96	48/50	At1g26820	Ribonuclease RNS3	RNA Synthese		1

Nummer	AFLP-Klon	Länge [bp]	Identität zu *A. thalinana* [%]	[bp/bp]	AGI Kode	Abgeleitete Funktion	Klassifizierung	Bemerkungen	ESTs -
81	48,2	107	86	81/94	At4g33050	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		4
82	48,3	64	91	33/36	At1g73820	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Mitochondrium	2
83	49,1	51	92	36/39	At5g54170	Membran-assoziiertes Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	2
84	50,1	41	96	30/31	At2g30770	putatives Cytochrom P450	Stressantwort	Mitochondrium	2
85	52,1	97	100	32/32	At5g46250	putatives Protein	RNA Synthese		16
86	52,2	90	94	86/91	At5g16510	Amylogenin	Stressantwort		10
87	52,3	61	94	37/39	At3g04120	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	Primärstoffwechsel		107
88	52,4	106	90	97/107	At5g06330	Harpin-induzierbares Protei	Stressantwort	1 TMD	2
89	53,2	69	97	66/68	At2g29210	Prolin-reiches Protein	Signaltransduktion		8
90	53,3	55	98	51/52	At5g26710	Glutamyl-tRNA Synthetase	RNA Synthese	Chloroplast	10
91	53,4	105	91	88/96	At3g48650	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	1 TMD	-
92	54,1	185	90	115/127	At5g38420	Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase Vorstufe	Photosynthese	RuBisCO ssu 2b	179
93	54,2	172	100	41/41	At1g44780	putatives Protein	Signaltransduktion	EF-Hand	0
94	54,4	54	97	35/36	At5g47110	Lil3 Protein	Primärstoffwechsel	Chloroplast	13
95	55,1	130	93	118/126	At5g27380	Glutathion Synthetase GSH2	Schwefel- und Glutathionstoffwechsel		7
96	56,2	161	100	18/18	At1g54960	putative Protein-Kinase	Signaltransduktion		-
97	57,1	128	87	110/126	At5g38420	RuBisCO kleine Untereinheit 2b	Photosynthese		174
98	57,3	57	91	52/57	At5g54260	DNA-Reparatur- und Meiose-Protein Mre11	DNA Rekombination, Reparatur		-
99	58,1	136	88	97/109	At2g44460	putative Beta-Glucosidase	Stressantwort		-
100	58,3	29	96	24/25	At1g45145	Thioredoxin	Stressantwort		-
101	60,1	32	96	27/28	At1g65980	Peroxiredoxin	Stressantwort		34
102	61,1	140	97	68/69	At2g25840	putative Trytophanyl-tRNA Synthetase	RNA Synthese	Mitochondrium	1
103	69,4	58	100	24/24	At2g44290	Lipid-Transfer Protein	Transport	1 TMD	3
104	70,1	69	96	62/64	At2g29460	putative Glutathion S-Transferase	Schwefel- und Glutathionstoffwechsel		2
105	71,1	56	96	54/56	At2g06520	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	-
106	71,4	55	92	50/54	At2g30970	Aspartat Aminotransferase (AAT1)	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	13
107	72,2	73	100	54/54	At5g41340	E2, Ubiquitin-konjugierendes Enzyme 4	Prioteinabbau		-
108	72,3	144	85	73/85	At4g37930	Glycin Hydroxymethyltransferase	Primärstoffwechsel		-
109	73,2	55	95	45/47	At4g16155	Lipoamid Dehydrogenase (LPD2)	Primärstoffwechsel		-
110	73,3	87	96	80/83	At5g53850	putatives Protein	Primärstoffwechsel	AA-Biosynthese	4
111	73,4	60	98	52/53	At2g01850	Endo-Xyloglucan Transferase	Stressantwort	1 TMD	4
112	75,1	56	96	54/56	At2g06520	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	2 TMD	129
113	75,2	50	97	47/48	At3g09440	At-hsc70-3 Protein	Stressantwort		-
114	75,4	69	95	62/65	At5g37680	ADP-Ribosylations Factor	RNA Synthese		-
115	78,1	28	100	20/20	At1g80310	putativer Sulfat Transporter	Transport	9 TMD	5
116	78,4	26	96	71/74	At2g45300	5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase	Primärstoffwechsel	Chloroplast	13
117	79,1	95	88	88/93	At5g50960	Nukleotid-bindendes Protein	Signaltransduktion		3
118	79,2	43	100	24/24	At5g45180	Dimethylanilin Monooxygenase	Stressantwort	(N-Oxid-blidend)	-
119	79,3	183	95	171/183	At1g19870	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	3
120	79,4	32	96	28/29	At1g76720	putativer Iniziirungs-Faktor IF-2	Transkriptionskontrolle	P-Loop-Motiv	-

Nummer	AFLP-Klon	Länge	Identität zu *A. thalinana*		AGI Kode	Abgeleitete Funktion	Klassifizierung	Bemerkungen	ESTs
		[bp]	[%]	[bp/bp]					-
121	80,2	134	96	129/134	At1g52400	Beta-Glucosidase	Stressantwort	1 TMD	46
122	80,3	97	90	64/71	At5g01880	RING-H2-Finger Protein RHA3a	Transkriptionskontrolle	1 TMD	3
123	81,2	30	96	29/30	At1g10290	putatives Phragmoplastin	Stressantwort	P-Loop-Motiv	14
124	81,3	27	100	27/27	At5g62720	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	11
125	81,4	29	96	24/25	At1g45145	Thioredoxin	Stressantwort		11
126	86,3	138	91	130/134	At4g16260	Glucan Endo-1,3-beta-Glucosidase	Stressantwort		46
127	87,1	135	98	68/69	At3g12120	Omega-6 Fettsäure Desaturase	Primärstoffwechsel	ER Signalpeptid	107
128	87,2	143	84	55/65	At1g75940	Beta-Glucosidase (ATA27)	Stressantwort	ER Signalpeptid	-
129	87,4	47	100	21/21	At1g61460	S-like Rezeptor Kinase	Signaltransduktion (Rezeptorkinasen)		2
130	100,1	145	86	51/59	At4g30470	Zimtsäure-CoA Reductase	Stressantwort		20
131	100,2	126	95	97/102	At5g66570	"oxygen-evolving" Komplex im PSII	Photosynthese	Chloroplast	42
132	101,2	81	96	78/81	At4g11150	H+ ATPase	Transport	vakuoläre ATPase	32
133	101,4	65	97	38/39	At3g04120	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	Primärstoffwechsel		103
134	104,2	118	86	78/91	At4g19210	ABC transporter	Transport		10
135	105,1	137	99	81/82	At2g13560	Malat Oxidoreductase	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	3
136	105,2	137	89	118/133	At1g35710	putative Rezeptor-Kinase	Signaltransduktion (Rezeptorkinasen)	LRR-Region	1
137	105,3	162	92	143/154	At4g31550	WRKY 8	Transkriptionskontrolle		18
138	107,3	34	94	32/34	At5g15120	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		4
139	108,1	164	96	140/145	At4g36500	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Mitochondrium	11
140	110,3	75	91	68/75		genomische DNA, Chr. 3, P1 Klon:MSJ3	Nicht kodierende Region		-
141	113,1	29				Homo Sapiens Sequenz	Nicht *A. thaliana*		-
142	114,1	167	91	140/153	At1g72890	similar to disease resistance protein	Stressantwort	Chloroplast	3
143	115,1	113	95	67/64	At3g13880	Selen-bindendes Protein	Stressantwort	Mitochondrium	-
144	115,3	126	94	76/81	At4g02630	putative Serin/Threonin Protein Kinase	Signaltransduktion	Mitochondrium	3
145	118,1	71	92	65/71	At4g31550	WRKY 8	Transkriptionskontrolle		18
146	118,2	49	93	40/43		Nicht-kodierende Region	Nicht kodierende Region		-
147	119,1	54	94	49/52		Homo Sapiens Sequenz	Nicht *A. thaliana*		-
148	119,3	70	96	66/69	At2g29460	Glutathion-S-Transferase (GST22)	Schwefel- und Glutathionstoffwechsel		-
149	119,4	83	91	60/66	At1g75750	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	1 TMD	33
150	119,2a	99	91	83/91	At4g36500	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Mitochondrium	11
151	119,2b	181	94	170/181	At1g77420	putative Lipase	Stressantwort	Mitochondrium	3
152	120,1	43	100	27/27	At5g11770	NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon)	Primärstoffwechsel	Mitochondrium	36
153	120,2	108	93	53/57	At4g24820	Proteasome regulatoische Untereinheit	Proteinabbau		12
154	120,3	98	89	66/74	At4g29900	Ca2+ATPase	Transport		6
155	120,3	206	95	190/199	At5g03630	Monodehydroascorbat Reductase	RNA Synthese		15
156	120,4	57	98	56/57	At5g10560	putative Beta-Xylosidase	Primärstoffwechsel		6
157	121,1	103	93	91/98	At2g44460	putative Beta-Glucosidase	Stressantwort		1
158	122,2	88	91	80/88	At4g04610	5'-Adenylylsulfat Reduktase	Primärstoffwechsel	Chloroplast	11
159	123,1	78	93	65/70		Nicht kodierende Region	Nicht kodierende Region		-
160	123,2	74	76	71/93	At5g19780	Alpha-Tubulin	Primärstoffwechsel		47

Nummer	AFLP-Klon	Länge	Identität zu *A. thalinana*		AGI Kode	Abgeleitete Funktion	Klassifizierung	Bemerkungen	ESTs
		[bp]	[%]	[bp/bp]					-
161	123,4	73	98	48/49	At5g41340	Ubiquitin-conjugierendes Enzym	Proteinabbau		6
162	124,1	36	69	25/36	At3g50830	"cold acclimation" Protein	Stressantwort	5 TMD	10
163	124,2	40	97	38/39	At4g37770	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat Synthase	Stressantwort		-
164	124,3	37	100	37/37	At1g69620	putatives 60S ribosomales Protein L34	RNA Synthese		12
165	124,4	37	95	35/37		Chloroplastidäre nicht-kodierende Region	Nicht kodierende Region		-
166	125,2	115	93	68/73	At3g09260	Thioglucosidase 3D Vorstufe	Primärstoffwechsel		148
167	125,4	25	95	21/22	At2g47940	putative Serin-Protease	Primärstoffwechsel	Chloroplast	14
168	129,1	36	97	35/36	At3g50830	"cold acclimation" Protein	Stressantwort	5 TMD	10
169	129,2	86	93	52/56	At1g01170	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	1 TMD	3
170	129,3	77	99	76/77	At3g54500	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		7
171	129,4	77	96	48/50	At1g42960	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	8
172	130,2	203	95	104/110	At5g36210	putative Acyl-Peptid Hydrolase	Primärstoffwechsel	Chloroplast	6
173	130,3	203	98	102/106	At4g23600	Tyrosin-Transaminase	Primärstoffwechsel	AA-Biosynthese	13
174	131,1	45	97	39/40	At1g19870	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	3
175	132,1	78	97	76/78	At2g45500	putatives Protein	Signaltransduktion	P-Loop-Motiv	-
176	135,2	213	98	98/100	At4g24160	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	12
177	135,3	174	91	159/174	At1g30720	putative Reticulin-Oxidase	Primärstoffwechsel	Alkaloidbiosynthese	2
178	135,4	70	94	31/33	At1g30880	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Mitochondrium	-
179	136,1	73	89	65/73	At2g21610	putative Pectin-Esterase	Stressantwort	Zellwandaufbau	-
180	136,2	85	100	83/83	At5g42380	putative CDPK	Signaltransduktion	Chloroplast	2
181	136,3	90	93	81/87	At4g01870	Ähnlichkeit zu bakteriellem tolB-Protein	Signaltransduktion		7
182	137,1	54	97	44/45	At5g38410	RuBisCO kleine Untereinheit 2b	Photosynthese	Chloroplast	313
183	138,1	60	98	44/45	At4g24160	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Chloroplast	14
184	139,1	317	97	308/316	At1g52400	Beta-Glucosidase	Stressantwort	1 TMD	46
185	142,3	53	100	17/17	At5g20100	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Mitochondrium	-
186	143,3	37	93	31/33	At5g11070	NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon)	Primärstoffwechsel		4
187	144,2	152	99	148/149	At1g74270	putatives ribosomales Protein	RNA Synthese	Mitochondrium	3
188	145,1	151	95	143/149	At4g36500	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion	Mitochondrium	11
189	145,3	132	85	102/120	At1g54090	putatives Protein	Proteine unbekannter Funktion		1
190	146,1	87	85	52/58	At5g48380	putative Rezeptorkinase	Signaltransduktion (Rezeptorkinasen)	LRR X	3
191	147,2	62	100	27/27	At3g27240	putatives Cytochrom C	Stressantwort	Mitochondrium	26

Expressionsdaten der *Arabidopsis halleri* Experimente. Die Zahlen geben die relative Induktion des einzelnen Fragments durch den jeweiligen Stress an. Rot markierte Felder geben eine Signifikante Induktion um mindestens den Faktor zwei an.

	10 µM Cu	10 µM Cd	5 mM H_2O_2	**AFLP Klon**	**AGI Code**	**Funktion**
Mittel	1,19	1,11	0,86	---	At5g44340	beta-Tubulin (Konst. Kontrolle)
StAbw	0,34	0,34	0,20			
Mittel	0,54	1,00	1,14	---	At5g18380	16S (Konst. Kontrolle)
StAbw	0,06	0,35	0,26			
Mittel	2,05	1,08	2,24	---	---	Leerer Vektor
StAbw	0,21	0,42	0,22			
Mittel	1,67	3,02	3,02	4,2	At3g59300	Putatives Protein
StAbw	0,48	1,80	0,86			
Mittel	11,22	3,34	2,94	7 ,1	At2g30020	**Protein Phosphatase 2C**
StAbw	2,62	0,86	1,20			
Mittel	1,43	2,32	3,09	8,4	At2g24950	Putatives Protein
StAbw	0,44	1,94	1,26			
Mittel	1,00	1,72	1,57	10 ,1	At4g01370	MAP Kinase 4
StAbw	0,31	0,10	0,24			
Mittel	2,95	3,94	3,09	19,3	At5g49550	Phytoene Dehydrogenase
StAbw	0,84	1,79	2,46			
Mittel	1,56	2,48	3,50	22,1	At4g34630	Putatives Protein
StAbw	0,21	0,74	0,97			
Mittel	1,81	3,74	2,40	25,2	At4g34060	Putatives Protein
StAbw	0,38	1,11	0,08			
Mittel	1,83	3,53	3,25	25,3	At3g01860	Putatives Protein
StAbw	0,39	1,37	0,51			
Mittel	4,15	5,46	3,24	28,2	At5g22650	**Histone Deacetylase**
StAbw	0,51	1,16	0,53			
Mittel	12,99	5,82	5,29	28,3	At5g22650	**Histone Deacetylase**
StAbw	1,91	2,30	1,95			
Mittel	2,02	5,13	2,94	31,3	At2g41430	„dehydration-induced“ Protein (ERD15)
StAbw	0,43	2,72	1,09			
Mittel	2,03	3,01	1,40	31,4	At3g50930	Ähnlich zu BCS1 Protein
StAbw	0,41	0,25	0,71			
Mittel	1,38	5,25	3,76	32,2	At5g46630	AP47/50p (gb|AAB88283.1)
StAbw	0,61	0,91	0,26			
Mittel	3,76	3,10	3,10	33,1	At1g75560	DNA-bindendes Protein
StAbw	0,40	1,13	1,87			
Mittel	1,38	3,26	1,27	37,3	At5g54680	Putatives Protein
StAbw	0,20	0,71	0,04			
Mittel	7,50	8,85	3,70	38,4	At5g34850	“purple acid” Phosphatase, AtPAP26
StAbw	3,65	7,71	1,11			
Mittel	5,07	3,16	3,00	40,2	At1g17170	Glutathion S-Transferase
StAbw	1,77	0,36	0,47			
Mittel	0,92	3,45	2,40	44,3	At3g04120	Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase C Untereinheit (GapC)
StAbw	0,21	0,75	0,38			
Mittel	1,61	3,87	1,95	45,1	At4g37800	Endo-Xyloglucan Transferase
StAbw	0,33	0,55	0,20			

	10 µM Cu	10 µM Cd	5 mM H_2O_2	**AFLP Klon**	**AGI Code**	**Funktion**
Mittel	0,98	2,90	2,05	45,3	At1g74270	Putatives ribosomaesl Protein (L35a-like)
StAbw	0,11	0,34	0,01			
Mittel	1,53	4,28	2,34	46,1	At2g15870	Putatives Retroelement pol Polyprotein
StAbw	0,15	0,63	0,43			
Mittel	21,40	5,61	1,83	46,2	At5g06330	**"harpin-induced" Protein**
StAbw	3,15	1,20	0,36			
Mittel	4,11	5,56	2,06	48,2	At4g33050	Putatives Protein
StAbw	1,79	1,68	0,44			
Mittel	1,16	3,86	2,28	48,3	At1g73820	Unbekanntes Protein
StAbw	0,05	1,36	0,30			
Mittel	0,93	3,04	3,03	52,2	At5g16510	Amylogenin
StAbw	0,36	0,73	0,85			
Mittel	28,63	11,05	4,64	52,4	At5g06330	**"harpin-induced" Protein**
StAbw	3,04	0,85	0,18			
Mittel	3,88	6,13	4,43	53,2	At2g29210	Prolin-reiches Protein
StAbw	2,22	3,63	1,44			
Mittel	1,67	3,92	2,35	60,1	At1g65980	Peroxiredoxin - like protein
StAbw	0,60	2,49	0,49			
Mittel	3,70	3,52	2,58	---	At1g44350	Glutathionreduktase 1 (GR1)
StAbw	0,31	0,95	0,63			
Mittel	4,16	2,18	1,56		At5g27380	**Glutathionsynthetase (GSH 2)**
StAbw	0,45	0,85	0,46			
Mittel	0,69	7,86	3,51	---	At3g10920	Mn Superoxiddismutase 2 (MnSOD2)
StAbw	0,24	0,41	0,40			
Mittel	0,48	4,84	2,10	---	At3g09390	Metallothionein 2 (MT2)
StAbw	0,16	1,05	0,58			
Mittel	1,37	2,17	5,99	---	At1g62180	**AtAPR2**
StAbw	0,14	0,40	0,87			

Danksagung

Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsmöglichkeiten am IPB, die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit, für seine Diskussionsbereitschaft sowie für die Möglichkeit Ergebnisse meiner Arbeit auf Konferenzen vorstellen zu können.

Dr. Stephan Clemens gilt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die Diskussionsbereitschaft, die angenehme Atmosphäre und die vielen Anregungen und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Thomas Lahaye, Dr. Laurent Noel und Dr. Eric Marois vom Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle/ Wittenberg danke ich für die methodischen Anregungen sowie die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Prof. Dr. Enrico Martinoia von der Universität Zürich und Dr. Lucien Bovet von der Universität Neuchâtel danke ich für die schönen und herzlichen Aufenthalte in Neuchâtel.

Die Entstehung dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung der guten Seele unserer Arbeitsgruppe Marina Häußler sowie der enormen Sequenzierleistung von Regina Weiß unendlich schwerer gewesen, so dass ihnen mein ganz besonderer Dank gilt.
Auch allen Mitglieder der Schwermetallgruppe Dr. Anne-Claire Cazale, Dr. Emiko Harada, Claudia Simm, Pierre Tennsted und Michael Weber möchte ich für die gute Laboratmosphäre, das Gespür für den richtigen Humor im richtigen Moment („Nochmal!“) und die Hilfsbereitschaft herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Udo Roth für seine Anregungen und Tipps in Sachen Proteinbiochemie sowie Dr. Jason Rudd: „Thanks man!“.
Auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die stete Diskussionsbereitschaft gedankt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. K.-J. Dietz von der Universität Bielefeld und Prof. Dr. K. Humbeck von der Martin-Luther Universität Halle/ Wittenberg für die Anfertigung der Gutachten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Astrid Hunger. Danke für Deine Unterstützung und Deine Liebe, Du machst mich jeden Tag zum glücklichsten Menschen der Welt.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für all ihre Unterstützung und Liebe bedanken. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, im September 2003

Christoph Veß

Lebenslauf

Name:	Christoph Veß
Geburtsdatum:	13. September 1972
Geburtsort:	Baden-Baden
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig
Anschrift	Lafontainestr. 19 06114 Halle/Saale
1979-82	Besuch der Grundschule Bad Dürrheim
1982-83	Besuch der Ludwig-Uhland Grundschule in Leinfelden-Echterdingen
1983-92	Besuch der Immanuel-Kant Gymnasiums in Leinfelden-Echterdingen
1992-93	Zivildienst
1993-98	Studium der Biologie an der Eberhart-Karls Universität Tübingen Abschlüsse: Vordiplom Biologie 1995 Diplom Biologie 1998
1998	Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen Titel der Arbeit: “ Isolierung und Charakterisierung von Peptidtransportern aus *Lycopersicon esculentum* L. und *Arabidopsis thaliana* L.“ Betreuer: Dr. Doris Rentsch
Seit 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzenbiochemie Halle/S. und Promotion Betreuer: Prof. Dr. Dierk Scheel