

**Identifizierung und Charakterisierung von
Hyperakkumulationsfaktoren bzw. schwermetall-
regulierten Genen in *Arabidopsis halleri* und
*Arabidopsis thaliana***

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
Michael Weber
geboren am 28.05.1974 in Kulmbach

14. März 2005

1. Gutachter

Prof. Dr. Klaus Humbeck, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pflanzenphysiologie

2. Gutachter

PD Dr. Stephan Clemens, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale), Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Eigenschaften und biologische Relevanz von Zink und Kupfer als essentielle Schwermetalle.....	2
1.2	Bedeutung des nicht-essentiellen Schwermetalls Cadmium in der Natur.....	4
1.3	Metallhomöostase-Netzwerk.....	5
1.4	Mobilisierung.....	6
1.5	Aufnahme und Sequestrierung.....	6
1.5.1	Aufnahmetransporter.....	7
1.5.2	Chelatoren.....	8
1.5.2.1	Metallothioneine (MTs).....	8
1.5.2.2	Organische Säuren und Aminosäuren.....	9
1.5.2.3	Nicotianamin.....	9
1.5.2.4	Phytochelatine (PCs).....	10
1.5.3	Xylembeladung.....	10
1.5.4	Xylementladung und Verteilung im Gewebe.....	11
1.5.5	Intrazelluläre Verteilung.....	11
1.5.5.1	Verteilungstransporter.....	12
1.5.5.2	Chaperone.....	12
1.6	Signaltransduktionsprozesse als Antworten auf veränderte Schwermetallversorgung.....	13
1.7	Schwermetalltoleranz und Hyperakkumulation.....	14
1.8	Phytoremediation.....	15
1.9	<i>Arabidopsis halleri</i> als Modellpflanze.....	16
1.10	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide.....	19
2.1.2	Nährmedien.....	19
2.1.3	Mikroorganismen und Plasmide.....	20
2.2	Kultivierung von Bakterien und Hefen.....	21
2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	21
2.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
2.3	Pflanzenanzucht und Streßbehandlung.....	21
2.3.1	Oberflächensterilisation.....	21
2.3.2	Kultivierung in Erde.....	21
2.3.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	21
2.3.2.2	<i>Arabidopsis halleri</i> (L.) O`Kane & Al-Shehbaz.....	21
2.3.3	Kultivierung in Flüssigmedium (= Schüttelkultur).....	22
2.3.4	Kultivierung im hydroponischen System.....	22
2.3.4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	22
2.3.4.2	<i>Arabidopsis halleri</i> (L.) O`Kane & Al-Shehbaz.....	22
2.3.5	„detached leaves“-Experimente (verändert nach Ichimura <i>et al.</i> , 2000).....	22
2.3.6	Streßbehandlung von hydroponischen Kulturen.....	22

2.4	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.4.1	Standardmethoden.....	23
2.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.4.3	RNA-Isolation.....	23
2.4.4	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen für PCR-Reaktionen.....	24
2.4.5	Isolation genomischer DNA für <i>Southern</i> -Blot Analysen.....	24
2.4.6	<i>Northern</i> -Transfer.....	25
2.4.7	<i>Southern</i> -Transfer.....	25
2.4.8	Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten.....	25
2.4.9	Radioaktive Hybridisierung.....	25
2.4.10	RT-PCR.....	26
2.4.11	RACE (R apid A mplification of C DNAs E nds).....	26
2.4.12	Quantitative real-time PCR.....	26
2.4.13	Agrobakterien-Transformation.....	26
2.4.14	Pflanzentransformation.....	27
2.4.15	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.4.16	Hefe-Wachstums-Test.....	27
2.4.17	cDNA-AFLP (A mplified F ragment L ength P olymorphism).....	27
2.4.17.1	Gesamt- und m-RNA Isolation.....	27
2.4.17.2	cDNA Synthese.....	28
2.4.17.3	Restriktionsverdau und Adapterligation.....	28
2.4.17.4	Präamplifikation.....	28
2.4.17.5	Radioaktive Markierung der <i>ApoI</i> +2-Primer.....	28
2.4.17.6	Selektive Amplifikation.....	29
2.4.17.7	Klonierung von AFLP-Fragmenten.....	29
2.4.18	Affymetrix-Microarray.....	29
2.4.18.1	RNA Isolation.....	29
2.4.18.2	cDNA-Synthese.....	29
2.4.18.3	<i>In vitro</i> Transkription.....	30
2.4.18.4	Fragmentierung der cRNA.....	30
2.4.18.5	Hybridisierung und Färben der Microarrays.....	30
2.4.18.6	Scannen und Standardisierung der Microarrays.....	31
2.4.18.7	Auswertung der Microarrays.....	31
2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	31
2.5.1	2D-Gelelektrophorese.....	31
2.5.1.1	Proteinisolation.....	31
2.5.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
2.5.1.3	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension).....	32
2.5.1.4	SDS-PAGE (2. Dimension).....	32
2.5.1.5	Silberfärbung.....	33
2.6	Analytische Methoden.....	33
2.6.1	Atomabsorptionsspektrometrie.....	33
2.6.1.1	Waschen der Proben.....	33
2.6.1.2	Aufschluß und Analyse der Proben.....	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Identifizierung potentieller Hyperakkumulationsfaktoren in <i>A. halleri</i>	34
3.1.1	Konstitutiver Vergleich zwischen <i>A. thaliana</i> und <i>A. halleri</i>	34
3.1.2	Bestätigung der Microarrayergebnisse mittels RT-PCR.....	37
3.1.3	Weniger stringente Auswertung der Affymetrixdaten.....	38

3.1.4	Nähere Charakterisierung einzelner Kandidatengene.....	41
3.1.4.1	Zinkabhängige Expression von <i>NAS2</i> und <i>ZIP9</i>	41
3.1.4.2	<i>ZIP9</i> (<u>Z</u> RT <u>I</u> RT-like <u>P</u> rotein 9).....	42
3.1.5	Nicotianamin-Synthase.....	44
3.1.6	Identifikation der molekularen Mechanismen der erhöhten <i>AhNAS2</i> - Expression.....	46
3.1.6.1	<i>Southern</i> -Blot Analyse.....	46
3.1.7	Heterologe Expression von <i>AhNAS2</i> in <i>A. thaliana</i>	47
3.1.8	O-Acetylserin-(thiol)-Lyase 2 (= <i>OAS A2</i>).....	49
3.2	Identifizierung und Charakterisierung metallregulierter Gene.....	50
3.2.1	cDNA-AFLP.....	50
3.2.2	Statistische Auswertung.....	50
3.2.3	Überprüfung des Expressionsmusters mittels RT-PCR.....	51
3.2.4	Analyse von Knockout-Pflanzen.....	53
3.2.5	Wurzelwachstumsversuche.....	56
3.3	Microarray.....	56
3.3.1	Evaluierung der Streßbehandlung mittels AAS (<u>A</u> tom <u>a</u> bsorptions- <u>s</u> pektrometrie).....	57
3.3.2	Transkriptomanalyse mittels Affymetrix-Microarrays.....	59
3.3.3	Datenauswertung.....	59
3.3.4	Identifizierung induzierter (bzw. reprimierter) Gene.....	60
3.3.4.1	Niedrig-Cadmium (N-Cd) und hoch-Cadmium (H-Cd) bei <i>A. thaliana</i>	60
3.3.4.2	Kupfer bei <i>A. thaliana</i>	63
3.3.4.3	Niedrig-Cadmium (N-Cd) und hoch-Cadmium (H-Cd) bei <i>A. halleri</i>	65
3.3.4.4	Kupfer bei <i>A. halleri</i>	67
3.3.4.5	Unabhängige Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mittels quantitativer realtime-PCR.....	69
3.3.4.6	Vergleich zwischen <i>A. thaliana</i> und <i>A. halleri</i>	72
3.3.4.7	Charakterisierung einiger Gene der Kernantwort.....	74
3.3.5	2D-Gelelektrophorese.....	75
4	Diskussion.....	78
4.1	Konstitutiver Vergleich zwischen <i>A. thaliana</i> und <i>A. halleri</i> mittels Affymetrix- Microarrays.....	78
4.2	Identifikation potentieller Hyperakkumulationsfaktoren.....	80
4.3	Detaillierte Charakterisierung von <i>NAS2</i> und <i>ZIP9</i>	83
4.3.1	<i>AtZIP9</i> und <i>AhZIP9</i>	83
4.3.2	<i>AtNAS2</i> und <i>AhNAS2</i>	84
4.3.3	Molekulare Mechanismen der erhöhten <i>AhNAS2</i> -Expression.....	87
4.4	Identifizierung und Charakterisierung schwermetallregulierter Gene.....	89
4.4.1	cDNA –AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	89
4.4.2	Microarray.....	91
4.4.2.1	Cadmiumstreß.....	92
4.4.2.1.1	<i>A. thaliana</i>	92
4.4.2.1.2	<i>A. halleri</i> und Vergleich beider Arten.....	97
4.4.3	Kupfer (<i>A. thaliana</i> und <i>A. halleri</i>).....	98
4.4.4	Weiterführende Vergleiche aller Microarrays beider Arten.....	101
4.4.4.1	Metallische Kernantwort.....	101
4.4.4.2	Cd ²⁺ -spezifische Gene.....	102

5 Zusammenfassung.....	104
5.1 Identifikation potentieller Hyperakkumulationsfaktoren in <i>A. halleri</i>	104
5.2 Identifikation und Charakterisierung metallregulierter Gene.....	105
 Literaturverzeichnis.....	 106
 Anhang.....	 i
Anhang A: verwendete Oligonukleotide.....	i
Anhang B: spezielle PCR-Programme.....	iii
Anhang C: cDNA-AFLP-Klonliste.....	iv
Anhang D: zusätzliche Microarray-Listen.....	ix

Abkürzungen:

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AFLP	„amplified fragment length polymorphism“
AGI	<i>Arabidopsis thaliana</i> Gene Index
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	„base pair“ (Basenpaar)
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
CDF	„cation diffusion facilitator“
cDNA	„complementary DNA“ (komplementäre DNA)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Col-0	Columbia- 0 (Wildtyp: <i>A. thaliana</i>)
cRNA	„complementary RNA“ (komplementäre RNA)
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-Triphosphat
DCdI	dosisabhängig Cadmium- induziert
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-Deoxyuridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	„expressed sequence tag“
GFP	„green fluorescent protein“
GSH	Glutathion
HA	Hämagglutinin
HBED	N,N'-di-(2-hydroxybenzoyl)-ethylendiamin-N,N'-diacetat
H-Cd	hoch-Cadmium
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HMA	„heavy metal ATPase“
HSP	„heat shock protein“ (Hitzeschockprotein)
IK	Induktionskoeffizient
IRT	„iron regulated transporter“ (Eisen regulierter Transporter)
kb	„kilo base“ (kilo Base)
kPa	Kilopascal
LB	„left border“
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Murrashig-Skoog
MT	Metallothionein
MTs	Metallothioneine
NAS	Nicotianamin-Synthase
N-Cd	niedrig-Cadmium
NCdI	niedrig-Cadmium- induziert
NRAMP	„natural resistance associated macrophage proteins“
OD	optische Dichte
PC	Phytochelatin
PCs	Phytochelatine
PCR	„polymerase chain reaction“

P-M	Protein-Mißfaltung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
r	Pearsonscher Korrelationskoeffizient
RB	„right border“
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcriptase polymerase chain reaction“
ROS	„reactive oxygen species“ (reaktive Sauerstoffspezies)
RUBISCO	Ribulose -1,5 bisphosphatcarboxylase
s-HSP	„small heat shock protein“ (kleines Hitzeschockprotein)
SDS	„sodiumdodecylsulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
ssp.	Subspezies
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
U	„unit“
U/min	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
UV	ultraviolett
(v/v)	„volume per volume“
(w/v)	„weight per volume“
(w/w)	„weight per weight“
YS	„Yellow Stripe“
ZAP	„zinc-responsive activator protein“
ZIP	„ZRT, IRT-like protein“
ZNT	„zinc transporter“
ZRT	„zinc regulated transporter“
Σ	Summe

1 Einleitung

Die menschliche Ernährung basiert auf den zentralen, für die Energiegewinnung wesentlichen, Bausteinen Eiweiße, Kohlenhydrate und Fette. Neben diesen Nahrungsbestandteilen, die mengenmäßig den größten Anteil an unserer Ernährung einnehmen, sind aber auch Vitamine und Spurenelemente essentiell für unser Überleben. Dieser Umstand wird besonders deutlich, wenn man sich bestimmte Mangelkrankungen vor Augen hält. So führt z.B. eine unzureichende Versorgung mit dem Spurenelement Eisen zu Eisenmangel-Anämie, die sich unter anderem durch Müdigkeit, Kälteintoleranz oder psychische Labilität äußert (Siegenthaler, 2000). Mangelkrankungen sind aber nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Tieren und Pflanzen zu beobachten, da Spurenelemente für alle lebenden Organismen essentiell sind. Dabei besteht die Gruppe der Spurenelemente fast ausschließlich aus Schwermetallen (siehe Abbildung 1), welches Elemente sind, deren Dichte größer als 5 g/cm^3 ist (Elmsley, 2001).

I _a	II _a	III _b	IV _b	V _b	VI _b	VII _b	VIII _b	I _b	II _b	III _a	IV _a	V _a	VI _a	VII _a	VIII _a		
H															He		
Li	Be									B	C	N	O	F	Ne		
Na	Mg									Al	Si	P	S	Cl	Ar		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt									

■ pflanzliche Spurenelemente
■ Schwermetalle aus der Gruppe der Spurenelemente
■ nicht-essentielle Schwermetalle

Abbildung 1: Auszug aus dem Periodensystem der Elemente. Aus der Gruppe der nicht-essentiellen Schwermetalle wurden lediglich die wichtigsten Vertreter farblich hervorgehoben.

Die wichtigsten Vertreter sind Eisen, Zink, Nickel, Kupfer und Mangan, die hauptsächlich als metallische Cofaktoren in Enzymen eine wichtige Rolle spielen. Neben diesen essentiellen Schwermetallen gibt es aber auch nicht-essentielle Schwermetalle, die bereits in niedrigen Konzentrationen toxisch wirken. Die bedeutendsten Vertreter dieser Gruppe sind Cadmium, Blei, Arsen und Quecksilber.

Da in der hier vorliegenden Arbeit die drei Schwermetalle Zink, Kupfer und Cadmium eine zentrale Rolle einnehmen, soll im folgenden etwas näher auf die Charakteristika dieser Elemente eingegangen werden.

1.1 Die Eigenschaften und biologische Relevanz von Zink und Kupfer als essentielle Schwermetalle

30	65,37
Zn	
Zink	
$4s^2 3d^{10}$	

Zink ist eines der wichtigsten Spurenelemente und mengenmäßig nach Eisen das zweithäufigste Übergangsmetall im menschlichen Körper. Als Cofaktor stellt es einen zentralen Bestandteil vieler Proteine dar. Bis heute konnten weit über 300 Zinkenzyme aus allen sechs Enzymklassen und in unterschiedlichen Arten aller Organismenreiche identifiziert werden (Christianson, 1991; Coleman, 1992; Vallee & Auld, 1990). Zink ist somit der in der Natur am häufigsten vorkommende Metall-Cofaktor von Enzymen und spielt sowohl als katalytische als auch als strukturelle Komponente eine wichtige Rolle (Marschner, 1995). Im ersten Fall nimmt es direkt an der chemischen Katalyse teil (z.B. Carboanhydrase), wohingegen es im zweiten Fall ausschließlich für die Stabilisierung der Proteinstruktur (z.B. Zinkfinger-Proteine) bzw. von Biomembranen verantwortlich ist.

Die hohe Abundanz von Zink in biologischen Systemen ist durch seine besonderen Eigenschaften zu erklären. Ein wichtiger Punkt ist, daß es in seiner biologisch relevanten Form (Zn^{2+}) nicht an Redoxreaktionen teilnimmt, da das d-Orbital mit der maximalen Anzahl an Elektronen (d^{10}) gefüllt ist (McCall *et al.*, 2000). Im Unterschied zu Kupfer (siehe unten) ist es damit ein sehr „sicheres“ Übergangsmetall, da es nicht die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = **R**eactive **O**xxygen **S**pecies) begünstigt. Das zweite wichtige Charakteristikum von Zink ist seine Fähigkeit, als Lewis-Säure zu agieren. Aus diesem Grund kann es starke, aber auch leicht austauschbare Ligandenbindungen eingehen (Williams, 1989). Als Liganden fungieren hierbei hauptsächlich Schwefel- und Stickstoffatome (Fraústo da Silva & Williams, 2001).

Neben diesen positiven Eigenschaften kann aber ein Überschuß an Zink zu toxischen Effekten führen. Im Falle eines zu hohen Zinkangebotes kann z.B. in Pflanzen die Photosynthese auf verschiedenen Ebenen beeinträchtigt werden. So ist es möglich, daß Zn^{2+} das an den Thylakoidmembranen gebundene Mn^{2+} im wasserspaltenden Komplex des Photosystems II (PS II) verdrängt. Da Zn^{2+} die Photolyse des Wassers nicht katalysieren kann, wird der Elektronentransport im PS II inhibiert. Darüber hinaus kann ein Überschuß an Zn^{2+} auch zur partiellen Verdrängung von Mg^{2+} aus dem aktiven Zentrum der RUBISCO führen. Durch diesen Austausch wird die Affinität der RUBISCO für CO_2 reduziert und letztendlich die Dunkelreaktion der Photosynthese inhibiert (van Assche & Clijesters, 1986).

Neben einer Zinkübersorgung kann es in der Natur aber auch zu Zinkmangel kommen, der die Pflanze ebenfalls vor Probleme stellt. Bei Zinkdefizienz kommt es zum einen zu einer Beeinflussung der Membranintegrität, was sich in einer veränderten Permeabilität niederschlägt. Zum anderen werden Enzyme, die bei der Bekämpfung von ROS eine wichtige Rolle spielen (z.B. Cu/Zn-Superoxiddismutase, Katalase), inhibiert (Cakmak, 2000). Die dadurch resultierende erhöhte Produktion von ROS kann ebenfalls zu Schädigungen an Membranen führen oder sogar DNA-Schäden hervorrufen (Ho *et al.*, 2003).

29	63,55
Cu	
Kupfer	
$4s^1 3d^{10}$	

Wie auch Zink erfüllt Kupfer wichtige Aufgaben in fast allen Organismen und zählt deshalb ebenfalls zu den essentiellen Schwermetallen. Die bedeutende Rolle dieses Übergangsmetalls im Stoffwechsel vieler Lebensformen wird besonders deutlich, wenn man sich die Folgen von gestörter Kupferhomöostase betrachtet. Beim Menschen gibt es zwei sehr gut untersuchte Kupferstoffwechselstörungen, die Menkes-Syndrom und Morbus Wilson genannt werden (Puig & Thiele, 2002). Beide

Erkrankungen beruhen auf genetischen Defekten in P-Typ ATPasen, die zu einer gestörten Kupferverteilung im Körper führen. Beim Menkes-Syndrom ist eine P-Typ ATPase des post-Golgi-Apparates aufgrund einer Mutation komplett funktionslos geworden. Durch den Verlust der Transportaktivität wird der Kupfertransport innerhalb der Zellen unterbrochen (Himmelblau & Amasino, 2000). Diese Blockade führt zu einem systemischen Kupfermangel (Andrews, 2002), der sich beim Patienten unter anderem durch eine abnorme Entwicklung und schwere Störungen des zentralen Nervensystems äußert. Nur selten überleben die Patienten die ersten Lebensjahre (Sitzmann, 2002). Beim Morbus Wilson ist eine P-Typ-ATPase aus der Leber mutiert, die an der Kupferausscheidung beteiligt ist. Aufgrund dieses Defektes kommt es zu einer Kupferüberladung von Leber, Gehirn und anderen Organen. Die betroffenen Menschen leiden z.B. unter Leberschäden und neurologischen Symptomen, wie einer gestörten Motorik und psychischen Veränderungen bis hin zur Demenz (Baenkler *et al.*, 1999). Diese schwerwiegenden Erkrankungen unterstreichen die enorme Bedeutung von Kupfer, aber welche Eigenschaften machen es so unverzichtbar?

Kupfer ist das effektivste und bioverfügbarste zweiwertige Ion für die Bindung an organische Moleküle (Marschner, 1995). Darüber hinaus kommt es in biologischen Systemen in zwei Oxidationsstufen vor (Cu(II) = oxidiert, Cu(I) = reduziert). Da der Übergang zwischen diesen beiden Formen sehr leicht möglich ist, stellt das Kupferion einen ausgezeichneten Katalysator für Redoxreaktionen dar (Himmelblau & Amasino, 2000). Deshalb sind Kupferionen als Cofaktor von Enzymen an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie z.B. Atmung, Photosynthese und der Entgiftung von ROS beteiligt (Puig & Thiele, 2002).

In Pflanzen kann man alle Kupferenzyme in drei Klassen einteilen (Marschner, 1995). Die erste Gruppe repräsentieren die „blauen Proteine“ ohne Oxidase-Aktivität. Die Hauptfunktion dieser Proteine liegt im Ein-Elektronen-Transfer. Der prominenteste Vertreter dieser Proteinklasse ist das Plastocyanin. Es fungiert als Elektronenübertäger zwischen dem Cyt-b₆/f-Komplex und dem PS I im Lumen der Thylakoiden (Heldt, 1999). Interessanterweise sind mehr als 50 % der Kupferionen im Chloroplasten an Plastocyanin gebunden (Marschner, 1995). Die zweite Gruppe der Kupferenzyme stellen die „nichtblauen Enzyme“ dar, zu denen die Peroxidasen zählen. Diese Enzyme katalysieren den Abbau von Wasserstoffperoxid und sind unter anderem in die Ligninbildung involviert (Heldt, 1999). Die letzte Gruppe der Kupferenzyme sind die Multikupferenzyme. Sie enthalten mindestens vier Kupferatome pro Protein und zeigen Oxidaseaktivität. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist die Ascorbat-Oxidase, welche die Umsetzung von Ascorbat in Dehydroascorbat katalysiert. In kupferdefizienten Pflanzen verringert sich die Aktivität des Enzyms, weshalb es als Indikator für die Kupferversorgung einer Pflanze verwendet wird (Marschner, 1995).

Wie bereits erwähnt stellt die hohe Redoxaktivität den größten Vorteil von Kupfer dar, aber gleichzeitig ist diese auch sein größter Nachteil. Dies liegt daran, daß freie Kupferionen sehr effektiv die Bildung von ROS wie z.B. H₂O₂, O²⁻• oder OH• katalysieren (Rae *et al.*, 1999). Diese Radikale entstehen über die Haber-Weiss bzw. Fenton-Reaktion und greifen Biomembranen und Proteine an. Im Fall der Membranen führt dies zu Lipidperoxidationen, die wiederum eine veränderte Permeabilität der Membran verursachen. Im Fall der Proteine bzw. Enzyme kommt es z.B. zur Oxidation von Disulfidbrücken (Himmelblau & Amasino, 2000). Dies führt zu einer Zerstörung der Sekundärstruktur, was mit einer teilweisen oder vollständigen Inaktivierung der Enzyme einhergeht. Daraus ergibt sich, daß Pflanzen die intrazelluläre Konzentration an Cu²⁺ strikt regulieren müssen, da die beschriebenen Prozesse verstärkt ablaufen, wenn die Pufferkapazität der Zelle erschöpft ist. Makroskopisch macht sich eine Überversorgung mit Kupfer durch ein reduziertes Wurzelwachstum bemerkbar

(Marschner, 1995). Bei längerer Exposition kann es ebenfalls zu Inhibierung des Sproßwachstums kommen. Neben der Wuchshemmung kommt es auch zur Entstehung von Chlorosen, die auf die Zerstörung der Biomembranen zurückzuführen sind (Mattoo *et al.*, 1986).

1.2 Bedeutung des nicht-essentiellen Schwermetalls Cadmium in der Natur

48	112,4
Cd	
Cadmium	
$5s^2 4d^{10}$	

Cadmium zählt zu den nicht-essentiellen Schwermetallen, da bis heute nur ein einziges Enzym in der gesamten Tier- und Pflanzenwelt bekannt ist, welches Cadmium als Cofaktor benötigt. Hierbei handelt es sich um eine cadmiumspezifische Carboanhydrase der marinen Kieselalge *Thalassiosira weissflogii*, die unter Zinkmangelbedingungen die zinkabhängige Isoform ersetzen kann (Lane & Morel, 2000). Cadmium ist zwar natürlicherweise in der Umwelt verbreitet, doch durch landwirtschaftliche, bergbauliche und industrielle Aktivitäten kam es zu lokalen Anreicherungen (Das *et al.*, 1997). Dadurch ist ein großes Gesundheitsproblem für die Gesellschaft entstanden, da es durch die Nahrungskette zu einer Bioakkumulation von Cadmium kommen kann (Suzuki *et al.*, 2001). Dies ist insofern bedenklich, da Cadmium bereits in sehr niedrigen Konzentrationen toxisch auf lebende Zellen wirkt und im Verdacht steht, beim Menschen Krebs auszulösen (Vido, 2001). Bei Pflanzen führt eine übermäßige Belastung mit Cadmium zu Chlorosen, Wachstumsinhibierungen und dem Absterben von Wurzelspitzen (Kahle, 1993).

Die Toxizitätsmechanismen von Cadmium sind aber bis heute noch nicht vollständig verstanden. Derzeit ist bekannt, daß andere zweiwertige Ionen durch Cd^{2+} aus den aktiven Zentren von Enzymen verdrängt werden können (Stohs *et al.*, 2000), wodurch die katalytische Aktivität des Proteins verringert wird bzw. erlischt. Neben Fe^{2+} wird bevorzugt Zn^{2+} substituiert (Stohs *et al.*, 2000), da Cadmium und Zink sehr ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften haben. Ein Nebeneffekt dieser Substitution ist die Freisetzung von nicht-komplexierten Ionen, die ihrerseits die Produktion von ROS begünstigen können (Stohs & Bagachi 1995; Brennan *et al.*, 1996). Ein weiterer toxischer Effekt von Cadmium ist die Denaturierung von Proteinen oder ihrer katalytischen Gruppen, was ebenfalls einen Verlust der Enzymaktivität zur Folge hat (Hall, 2002). In Pflanzen ist ein weiterer Toxizitätsmechanismus die Störung der Photosynthese durch die Beschädigung der Lichtsammelkomplexe (Krupa, 1988) oder der Photosysteme (Siedlecka & Baszynsky, 1993). Darüber hinaus kann Cadmium auch die Öffnung der Stomata blockieren und somit den Wasserhaushalt stören. Diese Blockade beruht auf der Beeinflussung von Kalium-, Calcium- und Abszissinsäure-Strömen in den Schließzellen (Barcelo & Poschenrieder, 1990).

Allerdings sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß es aufgrund der bisherigen Erkenntnisse nicht möglich ist, den primären Angriffspunkt der Cadmiumionen und somit den Haupttoxizitätsmechanismus zu bestimmen, da es sich bei den beschriebenen Phänomenen auch um sekundäre Effekte handeln könnte. Dieser Umstand wirft jedoch gleichzeitig die Frage auf, ob es überhaupt einen Haupttoxizitätsmechanismus gibt oder ob die hohe Toxizität von Cd^{2+} auf dem Zusammenspiel vieler verschiedener Prozesse beruht.

Aber trotz der hohen Toxizität von Cadmium konnten Pflanzen Toleranzmechanismen entwickeln, die es ihnen ermöglichen auf kontaminierten Böden zu überleben. Für die

Entgiftung von Cadmiumionen sind hauptsächlich Phytochelatine (PCs) verantwortlich. Die wichtige Bedeutung von PCs wird durch die Tatsache unterstrichen, daß ein Verlust der PC-Synthaseaktivität in *A. thaliana* eine dramatische Verschlechterung der Cadmiumtoleranz zur Folge hat (Howden *et al.*, 1995). Es gibt aber auch andere Mechanismen, die bei der Bekämpfung von Cadmiumtoxizität eine Rolle spielen. Nach Cadmiumstreß wird z.B. auch die Expression von Hitzeschockproteine induziert (Vierling, 1991). Der Effekt dieser Proteine beruht auf dem Schutz von Membranen und Enzymen vor Denaturierung oder der Reparatur bereits geschädigter Proteine (Hall, 2002).

1.3 Metallhomöostase-Netzwerk

In Bezug auf Schwermetalle haben Pflanzen mit einem generellen Problem zu kämpfen. Auf der einen Seite müssen bestimmte essentielle Schwermetallionen wie z.B. Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} in ausreichendem Maße aufgenommen werden, auf der anderen Seite jedoch führt ein Überschuß dieser Ionen zu schwerwiegenden Problemen wie z.B. zu oxidativem Streß. Darüber hinaus sehen sich die Pflanzen auch mit nicht-essentiellen Metallionen konfrontiert, die toxisch auf den Stoffwechsel wirken. Aus diesem Grund benötigen Pflanzen ein fein reguliertes Aufnahme-, Verteilungs- und Entgiftungsnetzwerk für Metallionen. Dieses komplexe System (siehe Abbildung 2) kann man in fünf Teilprozesse unterteilen:

- Mobilisierung von Schwermetallionen aus dem Boden
- Aufnahme von Metallionen in die Wurzel
- Beladung des Xylems und nachfolgender Transport in den Sproß
- Entladung des Xylems mit anschließender Verteilung der Metallionen in die einzelnen Gewebe
- Verteilung der Metalle in die einzelnen Kompartimente einer Zelle

Im folgenden sollen nun diese fünf Teilprozesse genauer beleuchtet werden.

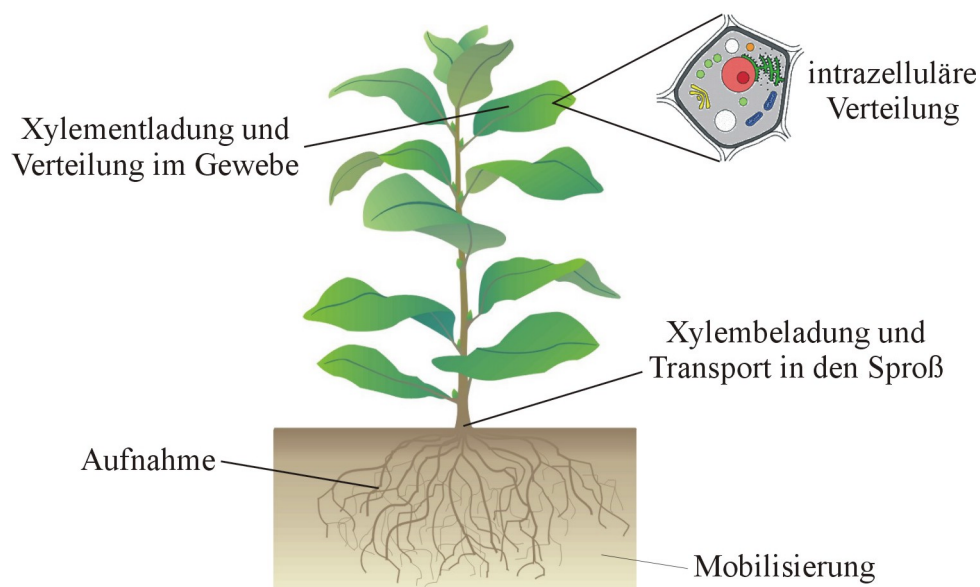


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Metallhomöostase-Netzwerkes in Pflanzen.

1.4 Mobilisierung

Der erste Schritt im Homöostase-Netzwerk ist wie erwähnt die Mobilisierung von Metallionen. Dieser Prozeß ist nötig, da in den meisten Böden zwar genügend Metalle vorhanden, diese aber nicht bioverfügbar sind. Der Grund hierfür liegt in der geringen Löslichkeit einzelner Metallionen, wie z.B. bei Eisen, das hauptsächlich als wasserunlösliches Eisenhydroxid vorliegt (Hell & Stephan, 2003). Um nun diese Barrieren zu überwinden, haben Pflanzen verschiedene Mechanismen entwickelt. Die einfachste Methode ist die Reduzierung des pH-Wertes in der Rhizosphäre durch den Export von Protonen. Durch die Ansäuerung wird die Löslichkeit und somit Verfügbarkeit der Metallionen deutlich erhöht. Eine weitere Möglichkeit zur Mobilisierung von Metallionen ist die Exkretion von metallchelatierenden Verbindungen wie z.B. organischen Säuren oder Phytosiderophoren.

Der genaue Wirkmechanismus dieser beiden Maßnahmen soll nun anhand von Eisen, bei dem diese Vorgänge am besten untersucht sind, näher erläutert werden. Generell kann man bei der Eisenaufnahme zwei Strategien unterscheiden. Alle höheren Pflanzen mit Ausnahme der Gräser verwenden die sogenannte Strategie I zur Eisenaufnahme (Römheld & Marschner, 1986). Hierbei werden zuerst Protonen über eine plasmamembranständige P-Typ ATPase in die Rhizosphäre abgegeben. Die dadurch erreichte Ansäuerung erhöht die Löslichkeit der Fe^{3+} -Ionen. Im nächsten Schritt wird Fe^{3+} zur besser löslichen Fe^{2+} Form reduziert. Diese Reaktion wird von einer Fe^{3+} -Chelat-Reduktase katalysiert. Am Schluß erfolgt die Aufnahme der Fe^{2+} -Ionen über Transporter der Plasmamembran (Hell & Stephan, 2003). Wie bereits erwähnt bilden die Gräser, zu denen einige der wichtigsten Nutzpflanzen wie Mais (*Zea mays*), Weizen (*Triticum aestivum*) und Reis (*Oryza sativa*) gehören, eine Ausnahme bei ihrer Eisenmobilisierung bzw. -aufnahme. Sie verwenden Strategie II, bei der Phytosiderophore von den Pflanzen in die Rhizosphäre abgegeben werden. Hierbei handelt es sich um nicht-proteinogene Aminosäuren, die in der Lage sind, Fe^{3+} -Ionen zu komplexieren (Takagi *et al.*, 1984). Nachdem die Phytosiderophore die Eisenionen komplexiert haben, werden die gesamten Komplexe mittels spezifischer Transporter in die Wurzel aufgenommen (Marschner & Römheld, 1994). Ferner können Phytosiderophore auch bei der Mobilisierung anderer Metallionen, wie Cu^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} , eine Rolle (Schaaf *et al.*, 2004). Es wurde z.B. beobachtet, daß die Sekretion von Phytosiderophoren auch unter Zinkmangel stattfindet (Zhang *et al.*, 1991; Tolay *et al.*, 2001).

An dieser Stelle soll außerdem erwähnt werden, daß neben einer Ansäuerung des Bodens und der Ausscheidung von Chelatoren, die Aufnahme von Metallen auch durch im Boden lebende Mikroorganismen gesteigert werden kann (Whiting *et al.*, 2001). Darüber hinaus können auch Mykorrhizapilze die Aufnahme von Metallen positiv beeinflussen (Schützendübel & Polle, 2002).

1.5 Aufnahme und Sequestrierung

Im Anschluß an die Mobilisierung der Metalle erfolgt die Aufnahme in die Wurzelzellen. Zunächst werden die Metallionen an der Zellwand gebunden, um dann über verschiedene Transportsysteme ins Cytoplasma aufgenommen zu werden. Bei diesen Aufnahmesystemen handelt es sich um Ionenkanäle oder protonengekoppelte Transporter. Das Vorhandensein von hochaffinen intrazellulären Bindungsstellen unterstützt die selektive Aufnahme der verschiedenen Metallionen (Clemens *et al.*, 2002a). Im Laufe der letzten Jahre konnten mit Hilfe molekularbiologischer Techniken verschiedene Transporter identifiziert und

charakterisiert werden. Nachdem heutigen Stand der Wissenschaft sind die meisten der Aufnahmesystem Mitglieder der ZIP- (ZRT-, IRT-like Protein) bzw. NRAMP- (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) Familie. Darüber hinaus sind aber auch Mitglieder der COPT- (COPper Transporter) und Oligopeptidtransporter-Familie an der Aufnahme von Metallionen in die Wurzel beteiligt. Die wichtigsten Vertreter der einzelnen Familien und deren Charakteristika sollen nun im nächsten Kapitel näher betrachtet werden.

1.5.1 Aufnahmetransporter

Biologische Membranen stellen für Metallionen physikalische Barrieren dar, weshalb die Passage über eine Membran durch integrale Membranproteine vermittelt wird. Mit Hilfe von Komplementationsstudien an verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae*-Aufnahmemutanten konnten einzelne Transporter näher charakterisiert werden.

Der wohl am besten untersuchte pflanzliche Transporter ist IRT1, der eine wichtige Rolle bei der Eisenhomöostase spielt. Beim Verlust dieses Transporters zeigen *A. thaliana*-Pflanzen Chlorosen und ein drastisch eingeschränktes Wachstum (Vert *et al.*, 2002). Die Expression des *IRT1*-Gens in der *S. cerevisiae*-Mutante *fet3 fet4*, die eine verminderte Eisenaufnahme zeigt, führte zu einer funktionellen Komplementation. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß neben Fe^{2+} auch Cu^{2+} , Mn^{2+} und Cd^{2+} von diesem Protein transportiert wird (Rogers *et al.*, 2000). Ebenfalls zur ZIP-Familie gehören die Transporter ZIP1-3, die durch Komplementationsstudien mit der *S. cerevisiae*-Mutante *zhy3* identifiziert wurden (Grotz *et al.*, 1998). Diese Mutante benötigt erhöhte Zinkkonzentrationen im Medium, da sowohl der hochaffine (Zrt1p), als auch der niedrigaffine (Zrt2p) Zinkaufnahmetransporter inaktiviert wurden. Durch die Komplementation des Zinkmangelphänotyps konnte gezeigt werden, daß die drei Transporter ZIP1-3 in der Lage sind, Zn^{2+} zu transportieren. Eine nähere Charakterisierung dieser Proteine ergab, daß sie auch in der Lage sind, Cu^{2+} und Cd^{2+} zu transportieren. Die beiden Gene *ZIP1* und *ZIP3* werden hauptsächlich in der Wurzel exprimiert und unter Zinkmangelbedingungen induziert (Grotz *et al.*, 1998). Für ein weiteres Mitglied dieser Familie, nämlich *ZIP4*, konnte keine Zinkaufnahme gemessen werden, wohingegen aber der homologe Transporter aus *Thlaspi caerulescens* (*ZNT1*) fähig war, den *zhy3*-Phänotyp zu komplementieren (Pence *et al.*, 2000).

Eine weitere Klasse von bereits beschriebenen Metalltransportern stellt die Familie der NRAMP-Transporter dar. Der erste Vertreter dieser Gruppe wurde ursprünglich in Mäusen identifiziert, als ein Gen, das Resistenz gegenüber Bakterien verleiht (Vidal *et al.*, 1993). Für drei der homologen Gene aus *A. thaliana* *AtNRAMP1*, *AtNRAMP3* und *AtNRAMP4* konnte eine Eisentransportaktivität nachgewiesen werden (Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2000), weshalb die Vermutung nahe liegt, daß sie eine Rolle in der Eisenhomöostase spielen. Weitere Untersuchungen mit GFP-Fusionsproteinen ergaben eine Lokalisation von *AtNRAMP3* im Tonoplasten, was, zusammen mit der gesteigerten Expression des Gens bei Eisenmangel, auf eine Rolle bei der Remobilisierung von Eisen aus der Vakuole hindeutet (Thomine *et al.*, 2003).

Neben den genannten Zink- und Eisentransportern konnten auch Kupferaufnahmesysteme in Pflanzen identifiziert werden. Für die Identifizierung von pflanzlichen Kupfertransportern wurde die *S. cerevisiae*-Mutante *ctr1-3* verwendet, bei der eine Defizienz bei der hochaffinen Kupferaufnahme besteht (Pena *et al.*, 2000). Komplementationsversuche mit diesem Stamm führten zur Identifizierung von fünf Kupfertransportern aus *A. thaliana*: *COPT1-5* (COPper Transporter) (Kampfenkel *et al.*, 1995; Sancenon *et al.*, 2003). Weiterführende RT-PCR-

Analysen zeigten, daß in den Wurzeln das Gen *COPT4* am stärksten exprimiert wird (Sancenon *et al.*, 2003). Dies deutet auf eine mögliche Teilnahme an der Kupferaufnahme in *A. thaliana* hin.

Für die Aufnahme von Metallen in die Wurzel sind nicht nur Transporter verantwortlich, die einzelne Metallionen transportieren, sondern es besteht auch – wie erwähnt - die Möglichkeit, daß Metalle in komplexierter Form aufgenommen werden. Diese Strategie wird von allen Gräsern bei der Eisenaufnahme verwendet (siehe 1.4). Ein Beispiel für einen solchen Transporter stellt YS1 (**Yellow-Stripe 1**) dar, der aus Mais (*Zea mays*) isoliert wurde. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Eisen-Phytosiderophorkomplexen. Eine verminderte Aktivität dieses Proteins führt zu Chlorosen, die auf einen Eisenmangel in der Pflanze zurückzuführen sind (von Wirén *et al.*, 1994). Neben Eisen können durch Phytosiderophore aber auch andere Schwermetallionen wie Zn^{2+} und Cu^{2+} komplexiert und aufgenommen werden. Aufnahmestudien an Gerste mit radioaktiv markierten Phytosiderophoren ergaben, daß Zn^{2+} - bzw. Cu^{2+} -Phytosiderophorkomplexe in die Wurzel aufgenommen werden (Zhang *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1993). Darüber hinaus konnte auch in Mais eine Zn^{2+} -Phytosiderophorkomplex-Aufnahme gemessen werden (von Wirén *et al.*, 1996). Bis heute war es aber leider nicht möglich, die entsprechenden Aufnahmesysteme zu identifizieren.

1.5.2 Chelatoren

Nach dem Transport der Metalle in die Wurzel erfolgt sofort eine Komplexierung der freien Ionen durch Chaperone oder Chelatoren (Clemens, 2001). Der Grund hierfür ist die Notwendigkeit der schnellen Bindung freier Metallionen, denn diese würden sonst die Generierung von ROS katalysieren, welche für die Zelle sehr toxisch sind (vergleiche 1.1). Chaperone transportieren die Metallionen spezifisch zu Organellen und Proteinen und werden in Kapitel 1.5.5.2 näher beschrieben. Chelatoren hingegen sind für die cytosolische Pufferung von Metallionen verantwortlich. Als Chelatoren in Pflanzenzellen fungieren hauptsächlich Metallothioneine, Phytochelatine, organische Säuren, Aminosäuren oder Nicotianamin (Clemens *et al.*, 2001).

1.5.2.1 Metallothioneine (MTs)

Metallothioneine sind cysteinreiche Proteine mit sehr geringem Molekulargewicht, die in der Lage sind, Metallionen in Metall-Schwefel-Clustern zu binden (Hamer, 1986). Man kann bei dieser Gruppe von Proteinen insgesamt vier Klassen unterscheiden, deren Differenzierung auf der unterschiedlichen Verteilung der Cysteine innerhalb der Proteine beruht. Metallothioneine sind in allen Eukaryonten und einigen Prokaryonten zu finden und erfüllen dort verschiedene Aufgaben. Für die MTs aus Säugern ist z.B. bekannt, daß sie vorwiegend Zink binden. Aus diesem Grund wird postuliert, daß sie an der cytosolischen Zinkpufferung beteiligt sind. Aus Hefe sind wiederum MTs bekannt, die der Klasse II angehören und hauptsächlich Cu^{2+} binden. Aufgrund dieser Tatsache geht man davon aus, daß sie einen der cytosolischen Kupferspeicher darstellen. Der prominenteste Vertreter der Hefe-MTs ist das Gen *CUP1* (**CU-binding Protein 1**) aus *S. cerevisiae*, welches in die Kupferdetoxifizierung involviert ist (Hamer *et al.*, 1985). Das erste pflanzliche MT wurde aus reifen Weizenembryonen isoliert

und wurde als E_c (Early Cys-labelled) Protein bezeichnet. Es ist der Klasse IV zuzuordnen und in der Lage, Zn²⁺ zu binden (Lane *et al.*, 1987).

1.5.2.2 Organische Säuren und Aminosäuren

Aufgrund der hohen Reaktivität von Metallionen mit Schwefel-, Stickstoff- oder Sauerstoffatomen, sind auch organische Säuren und Aminosäuren potentielle Chelatoren. Bei den organischen Säuren sind in diesem Zusammenhang vor allem Citrat, Malat und Oxalat zu nennen (Rausser, 1999). Für Citrat wurde z.B. gezeigt, daß es in nickelhyperakkumulierenden Pflanzen mit Nickel Komplexe bildet (Sagner *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde von Godbold *et al.* (1984) die Vermutung aufgestellt, daß Citrat ebenfalls zur Zinkakkumulation und -toleranz beitragen kann. Auch für Malat wurde die Hypothese aufgestellt, daß es als cytosolischer Zn²⁺-Chelator fungieren kann (Sarret *et al.*, 2002).

Aus dem Bereich der Aminosäuren ist bis heute nur ein einziges Beispiel bekannt, bei dem Schwermetalle durch eine Aminosäure komplexiert werden. Und zwar handelt es sich hierbei um die Bindung von Nickel an Histidin (Krämer *et al.*, 1996). Bei der Analyse der Nickelhyperakkumulierenden Pflanze *Allysum lesbiacum* konnte beobachtet werden, daß eine Überversorgung mit Nickel zu einem starken und proportionalen Anstieg von freiem Histidin führte. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, daß Nickel mit Histidin *in vivo* einen Komplex bildet (Krämer *et al.*, 1996).

1.5.2.3 Nicotianamin

Bei Nicotianamin (NA) handelt es sich um eine nicht-proteinogene Aminosäure, die durch die Kondensation von drei Molekülen S-Adenosyl-Methionin (SAM) entsteht (siehe Abbildung 3) und in allen höheren Pflanzen gebildet wird (von Wirén *et al.*, 1999).

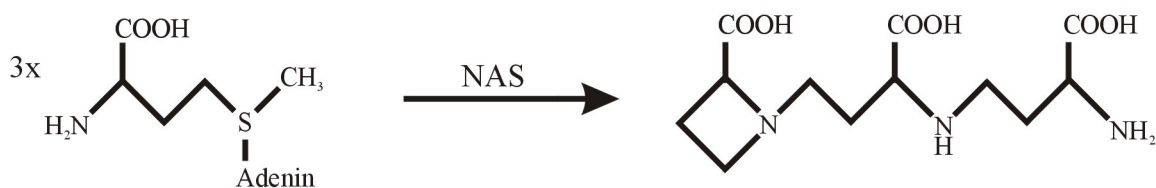


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Synthese von Nicotianamin. Der Reaktionsmechanismus ist eine Kondensation, die durch das Enzym Nicotianaminsynthase (NAS) katalysiert wird.

In Gräsern stellt es den Vorläufer des Phytosiderophores Mugininsäure („mugineic acid“) dar, das zur Eisenmobilisierung aus dem Boden in die Rhizosphäre sekretiert wird (vgl. 1.4). NA ist in der Lage verschiedene Metallionen wie Fe²⁺, Fe³⁺, Ni²⁺ oder Zn²⁺ zu komplexieren, wird in der Literatur aber fast ausschließlich als Bestandteil des Eisenhomöostase-Netzwerkes in Pflanzen diskutiert. Erste Hinweise auf die zentrale Rolle von NA in der Eisenhomöostase ergaben sich aus der Analyse der Tomatenmutante *Chloronerva*. Bei dieser Pflanze handelt es sich um eine Nicotianamin-auxotrophe Pflanze, die an jungen Blättern Chlorosen zwischen den Blattadern aufweist (Stephan & Scholz, 1993; Ling *et al.*, 1999). Dieser Phänotyp ist sehr typisch für Eisenmangel und läßt deshalb auf einen zu geringen Eisengehalt in der Pflanze

schließen. Erstaunlicherweise akkumuliert diese Pflanze aber unter normalen Bedingungen mehr Eisen als der Wildtyp (Pich & Scholz, 1991). Dieser anscheinende Widerspruch ist dadurch zu erklären, daß das Eisen in unlöslichen Phosphatkomplexen präzipitiert und somit für die Pflanze nicht mehr verfügbar ist. Becker *et al.* (1995) schlossen aus diesen Ergebnissen, daß NA essentiell ist, um Eisen in der Pflanze löslich und damit verfügbar zu halten.

Neben der Beteiligung von NA an der Eisenhomöostase gibt es auch Hinweise, daß NA für den Langstreckentransport anderer Metalle wichtig ist (Takahashi *et al.*, 2003). Bei der Untersuchung transgener Tabakpflanzen, die einen künstlich reduzierten Gehalt an NA aufwiesen, wurde festgestellt, daß auch die Menge an Eisen, Kupfer, Zink und Mangan in jungen Blättern reduziert war. Interessanterweise war der Effekt bei Kupfer am deutlichsten. Darüber hinaus konnte an diesen Pflanzen gezeigt werden, daß junge Blätter, die mit NA-haltigen Lösungen behandelt worden waren, einen höheren Gehalt an Kupfer und Zink hatten. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß NA neben der Eisenverteilung auch den Transport anderer Metalle wie Zink und Kupfer unterstützt.

1.5.2.4 Phytochelatine (PCs)

Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, können die meisten Aufnahmetransporter in den Wurzeln von Pflanzen verschiedene Metallionen transportieren. Diese bei manchen Transportern zu beobachtende geringe Selektivität bietet auf der einen Seite den Vorteil, daß verschiedene Ionen über ein und das selbe System aufgenommen werden können. Auf der anderen Seite jedoch sieht sich die Pflanze mit dem Problem konfrontiert, daß auch „unerwünschte“ – d.h. nichtessentielle, toxische – Metallionen aufgenommen werden. Als Gegenmaßnahme produziert die Pflanze daher verschiedene Moleküle, die in der Lage sind, diese toxischen Metalle zu komplexieren und sie dadurch zu entgiften. Den letzten Schritt dieser Entgiftung stellt dann meist der Transport in die Vakuole dar.

Die wohl am besten untersuchten Chelatoren für nicht-essentielle Schwermetalle sind Phytochelatine. Diese Peptide werden über eine zweistufige Reaktion aus mehreren Molekülen Glutathion (GSH) synthetisiert und haben folgende Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2-11$) (Grill *et al.*, 1985). Sie sind in der Lage, sehr effektiv Cd^{2+} zu binden und bilden dadurch sogenannte LMW-Komplexe (**L**ow **M**olecular **W**eight). Anschließend werden diese Komplexe in die Vakuole transportiert und dort unter Einlagerung von Schwefel zu HMW-Komplexen (**H**igh **M**olecular **W**eight) verbunden.

Die Synthese von PCs zur Detoxifizierung von toxischen Metallen findet man in Pflanzen, vielen Pilzen und auch einigen Tieren (Cobbet, 2000; Vatamaniuk *et al.*, 2001; Clemens *et al.*, 2001).

1.5.3 Xylembeladung

Nach der Aufnahme der verschiedenen Metalle in die Wurzel, muß ein Großteil dieser Ionen in den Sproß transportiert werden. Dies geschieht über das Xylem. Aufgrund des Casparischen-Streifens ist die freie Diffusion von Stoffen in die Xylemleitbahnen nicht möglich. Dies bedeutet, daß alle Substanzen, also auch die Metalle, den Wurzelsymplasten passieren müssen, um ins Xylem zu gelangen (Tester & Leigh, 2001). Bei dieser Passage bestimmen drei Reaktionen den Weg der einzelnen Metalle: Sequestrierung der Metalle

innerhalb der Wurzelzellen, symplastischer Transport in die Stele und Abgabe ins Xylem (Clemens *et al.*, 2002a). Der letzte Schritt, die Beladung des Xylems, ist ein sehr stark kontrollierter Prozeß, der durch membranständige Transportproteine vermittelt wird (Gaymard *et al.*, 1998). Ob bei diesem Transport die Metalle in ionischer Form oder zusammen mit Chelatoren transportiert werden, muß noch genauer untersucht werden, da dies bis jetzt noch nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. Bisher sind zwar Transporter bekannt, die Phytosiderophor- oder Nicotianamin-Metallkomplexe transportieren können (Schaaf *et al.*, 2004), aber bis heute konnte nur eine Beteiligung dieser Transporter bei der Aufnahme von Metallen in die Wurzel oder beim Beladen des Phloems (Kolke *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Ein bereits identifizierter Weg für die selektive Aufnahme von Ionen ins Xylem ist die Bindung spezieller Metalle an Chelatoren, wie Histidin (Krämer *et al.*, 1996), Nicotianamin oder Citrat (Clemens *et al.*, 2002a). Diese Komplexbildung sorgt für eine hauptsächliche Translokation der Metalle ins Xylem.

Betrachtet man sich nun den Transport innerhalb des Xylems, so erkennt man, daß es ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen den freien Chelatoren, hydratisierten Ionen und den Komplexen aus beiden Komponenten gibt. Nach dem Transport in den Sproß erfolgt meistens die Entladung der Metalle aus dem Xylem, in manchen Fällen kommt es aber auch zum Rücktransport über das Phloem (Schmidke & Stephan, 1995).

1.5.4 Xylementladung und Verteilung im Gewebe

Nachdem die Metallionen mit Hilfe des transpiratorischen Stroms den Sproß erreicht haben, kommt es zu einer Entladung des Xylems und zur Verteilung der Metalle innerhalb des pflanzlichen Gewebes. Im Gegensatz zur Entladung des Xylems, was ausschließlich in den Symplasten erfolgt, werden die Metalle innerhalb des Blattes sowohl über den Symplasten als auch über den Apoplasten verteilt (Karley *et al.*, 2000). Diese interzelluläre Verteilung konnte im Falle der Cadmiumdetoxifizierung bei Tabak gut beobachtet werden. Untersuchungen an cadmiumgestreßten Keimlingen ergaben, daß es zur Bildung von cadmiumhaltigen Kristallen in den Trichomen der Blätter kommt (Choi *et al.*, 2001). Da sich gleichzeitig ebenfalls die Zahl der Trichome verdoppelte, postulierten die Autoren, daß die Exkretion cadmiumhaltiger Kristalle durch die Trichome einen Mechanismus der Cadmiumentgiftung in Tabak darstellt. Untersuchungen am Zn/Cd-Hyperakkumulierer *A. halleri* konnten ferner zeigen, daß in dieser Pflanze, neben den Trichomen, vor allem die Mesophyllzellen der Blätter den Hauptspeicherort für Cadmium und Zink darstellen (Küpper *et al.*, 2000). In einem anderen Zn/Cd-Hyperakkumulierer (*Thlaspi caerulescens*) erfolgt jedoch die Speicherung von Zink hauptsächlich in den Epidermiszellen der Blätter und nicht in den Mesophyllzellen wie bei *A. halleri* (Zhao *et al.*, 2000). Diese Resultate machen deutlich, daß es in den verschiedenen Pflanzenarten unterschiedliche, aber gerichtete, Verteilungsströme für Metallionen gibt.

1.5.5 Intrazelluläre Verteilung

Haben die Metalle letztendlich ihre Zielzellen erreicht, werden sie über ein weiteres komplexes Netzwerk an die einzelnen Kompartimente bzw. Proteine verteilt. Für die Verteilung in die unterschiedlichen Kompartimente sind spezifische Transporter verantwortlich, die einer Vielzahl von Proteinfamilien zugeordnet werden können. Die bis

heute identifizierten Proteine sind Mitglieder der ABC-Transporter-, CDF-, P-Typ ATPasen- oder NRAMP-Familie. Im folgenden sollen die wichtigsten Vertreter dieser Transporter näher beschrieben werden.

1.5.5.1 Verteilungstransporter

Der Transporter AtNRAMP3 aus *A. thaliana* ist z.B. für die Remobilisierung von Eisen aus der Vakuole verantwortlich (Thomine *et al.*, 2003). Mitglieder der CDF-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Speicherung und Detoxifizierung durch den Transport in die Vakuole. Ein Vertreter dieser Gruppe aus *S. cerevisiae* – Zrc1p – transportiert Zn^{2+} und Cd^{2+} über die Vakuolenmembran (Kamazino *et al.*, 1989). Diese Aktivität ist auf der einen Seite für die Speicherung von Zink, auf der anderen Seite für die Detoxifizierung von Cadmium wichtig. Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist das Protein Zhfp aus *Schizosaccharomyces pombe*. Dieser Transporter ist im endoplasmatischen Reticulum und in der Kernhülle lokalisiert und hat einen starken Einfluß auf die Toleranz von *S. pombe* gegenüber unterschiedlichen Metallen (Clemens *et al.*, 2002b). Der erste pflanzliche CDF-Transporter war ZAT1 aus *A. thaliana* (van der Zaal *et al.*, 1999). Eine Überexpression des Proteins *in planta* führt zu einer erhöhten Zinktoleranz und einer leicht erhöhten Zinkakkumulation in den Wurzeln. Die Autoren deuteten diese Ergebnisse als einen Hinweis für die Beteiligung von ZAT1 an der Zinkentgiftung. Über die genaue Lokalisation des Proteins konnten aber leider keine Angaben gemacht werden. Neuere Arbeiten von Dräger *et al.* (2004) konnten jedoch zeigen, daß das Homolog zu AtMTP1 (= AtZAT1) aus *A. halleri* – AhMTP1 – in der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Darüber hinaus wurde durch die heterologe Expression von AhMTP1 der zinksensitive Phänotyp der *S. cerevisiae*-Mutante *zrc1 cot1* komplementiert. Diese Resultate zusammen mit ebenfalls durchgeführten Kreuzungsstudien wurden von den Autoren so gedeutet, daß AhMTP1 durch den von ihm vermittelten Transport von Zn^{2+} in die Vakuole eine wichtige Rolle bei der Zinktoleranz von *A. halleri* spielt.

Der bekannteste pflanzliche Vertreter der P-Typ-ATPasen ist der Kupfertransporter RAN1 (**R**esponsive to **A**Ntagonist **1**). Diese Protein ist für die Aufnahme von Kupferionen in post-Golgi-Vesikel und die damit verbundene Verteilung an verschiedene Proteine, wie z.B. den Ethylenrezeptor, verantwortlich (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste & Kieber, 2000).

1.5.5.2 Chaperone

Nach dem Erreichen des jeweiligen Kompartimentes müssen die Metallionen noch zu den Zielproteinen befördert werden. Dieser Schritt wird durch Chaperone vermittelt, da es in der Zelle zu einer Vielzahl von toxischen Reaktionen kommen würde, wenn die Metalle in freier Form diffundieren würden. Diese Behauptung wird durch die Ergebnisse von Rae *et al.*, (1999) gestützt. Kalkulationen der Autoren über freie Kupferionen in Hefezellen haben ergeben, daß im Durchschnitt weniger als ein Atom pro Zelle in freier Form vorliegt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Zinkionen in *E. coli* erhalten. Berechnungen von Outten & O'Halloran (2001) ergaben, daß nur etwa jede zehntausendste Zelle ein freies Zinkion enthält. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß auch innerhalb der Pflanze bzw. Pflanzenzelle die Ionen nahezu immer in komplexierter Form vorliegen müßten.

In *S. cerevisiae* z.B. findet man ein Kupferchaperon (Ccsp), das für die Versorgung der kupferabhängigen Superoxiddismutase (Sodp) verantwortlich ist (Culotta *et al.*, 1997). Bei

einem Verlust dieses Proteins kommt es zu einer Anhäufung der inaktiven Apo-Form der Sodp. Weiterführende Experimente ergaben, daß die Sodp direkt durch die Insertion eines Kupferatoms seitens des Ccsp aktiviert wird. Neben Ccsp sind noch weitere cytosolische Kupferchaperone aus Hefe bekannt. Eines dieser Chaperone ist Atx1p (**Anti oxidant 1**), welches in den Kupfertransfer zu post-Golgi-Vesikeln involviert ist (Lin & Culotta, 1995). Das homologe Gen *CCH* (**Copper CHaperone**) aus *A. thaliana* konnte durch Komplementationsstudien mit der *S. cerevisiae*-Mutante *atx1* identifiziert werden (Himmelblau *et al.*, 1998). Das Protein wird speziell in seneszenten Blättern gebildet und ist dort wahrscheinlich für die Rückgewinnung von Cu^{2+} verantwortlich (Mira *et al.*, 2001).

1.6 Signaltransduktionsprozesse als Antworten auf veränderte Schwermetallversorgung

Pflanzen reagieren, wie alle Organismen, auf Veränderungen in der Nährstoffversorgung. Bei einem Mangel an bestimmten Schwermetallen kommt es unter anderem zu einer erhöhten Transkription bestimmter Transporter, die für die Aufnahme dieser Metalle aus dem Boden verantwortlich sind. So werden bei *A. thaliana* im Falle von Eisenmangel z.B. die Gene der Transporter IRT1 und FRD3 vermehrt exprimiert, um eine gesteigerte Aufnahme von Fe^{2+} zu erreichen (Eide *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 2002). Parallel dazu wird die Expression von Genen wie *NRAMP3* erhöht, dessen Genprodukt eine Remobilisierung von Eisen aus der Vakuole vermittelt. Neben einer transkriptionellen Antwort gibt es auch Hinweise über Regulationsmechanismen auf post-translationaler Ebene. So konnte für den Transporter IRT1 gezeigt werden, daß eine konstitutive Überexpression dieses Gens nur dann zu einer erhöhten Proteinmenge führt, wenn die Pflanze unter Eisendefizienz leidet (Connolly *et al.*, 2002).

Diese Vielzahl an unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen macht es deutlich, daß in Pflanzen ein differenziertes Signaltransduktionsnetzwerk vorhanden sein muß, um diese Prozesse zu steuern. Dies umfaßt die Perzeption der intrazellulären Metallkonzentrationen, die Weiterleitung dieser Information über Signaltransduktionskaskaden sowie die Regulation der Expression von Zielgenen.

Allerdings ist das Wissen über solche Prozesse in Pflanzen sehr begrenzt und bedarf deshalb einer gründlichen Aufklärung. Anders stellt sich die Situation bei der Hefe *S. cerevisiae* dar. Bei diesem Organismus konnten verschiedene regulatorische Mechanismen identifiziert und charakterisiert werden, die bei einer Antwort auf veränderte Metallversorgung eine Rolle spielen. So ist bekannt, daß der Transkriptionsfaktor (Zap1p) die Expression verschiedener Gene, die an der Zinkakkumulation und -speicherung beteiligt sind, kontrolliert (Zhao & Eide, 1997). Weiterführende Arbeiten von Bird *et al.* (2003) konnten darüber hinaus zeigen, daß zwei der acht Zinkfinger-Motive dieses Proteins nicht an der DNA-Bindung beteiligt sind, sondern für die Detektion der cytosolischen Zn^{2+} -Konzentration verantwortlich sind und somit wahrscheinlich als Zinksensor dienen.

Auch in Bezug auf die Kupferhomöostase konnten in *S. cerevisiae* regulatorische Mechanismen identifiziert werden. Arbeiten von Zhu *et al.* (1998) konnten zeigen, daß der Transkriptionsfaktor Mac1p eine zentrale Rolle bei der Regulation der intrazellulären Kupferkonzentration spielt. Für die Aufnahme von Cu(I) in die Hefezelle sind die beiden Transporter Ctr1p und Ctr3p, sowie eine Fe(III)/Cu(II)-Reduktase nötig, die von dem Gen *FRE1* codiert wird. Bei Kupfermangel wird die Expression dieser Gene durch Mac1p induziert, der an spezifische Cis-Elemente im Promotorbereich dieser Gene bindet. Überschreitet die intrazelluläre Kupferkonzentration infolge der gesteigerten Aufnahme einen

bestimmten Schwellenwert, muß die Aufnahme rate wieder gesenkt werden, da eine zu hohe Kupferkonzentration gefährlich für die Zelle ist. Diese Reduktion der Kupferaufnahme erfolgt wiederum über die – spezifisch durch die Kupferionen aktivierte – Degradation von Mac1p (Zhu *et al.*, 1998).

1.7 Schwermetalltoleranz und Hyperakkumulation

Aufgrund von Veränderungen im Stoffwechsel, die sich im Zuge der Evolution entwickelt haben, eröffnete sich für eine Gruppe von Pflanzen die Möglichkeit, auf schwermetallbelasteten Böden zu überleben und sich fortzupflanzen. Diese Pflanzen werden gemäß ihrer besonderen Eigenschaft auch als Metallophyten bezeichnet und haben meistens eine erhöhte Metalltoleranz gegenüber einem einzelnen Schwermetall (Verkleij & Schat, 1990). Im allgemeinen gibt es zwei Basisstrategien für eine Erhöhung der Toleranz (Baker, 1981). Die eine Strategie beruht auf dem Prinzip des Vermeidens. Das bedeutet, daß Pflanzen - selbst bei hohen externen Metallkonzentrationen - verhindern können, daß toxische Metalle in die Pflanze gelangen. Diese Pflanzen werden auch als „Excluder“ bezeichnet. Die andere und in der Natur weiter verbreitete Strategie der Toleranz beruht auf der Hyperakkumulation. Die Pflanzen dieser Gruppe sind in der Lage, große Mengen an Schwermetallen im Sproß zu akkumulieren. Laut Definition wird eine Pflanze als Hyperakkumulierer bezeichnet, wenn sie mehr als 1 % Zink, 0,1 % Nickel, Cobalt, Blei bzw. 0,01 % Cadmium in der Trockenmasse anreichern kann. Zur Zeit sind mehr als 400 hyperakkumulierende Arten aus mindestens 45 verschiedenen Familien bekannt (Baker & Brooks, 1989). Eine exemplarische Zusammenstellung einiger wichtiger Pflanzen ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Exemplarische Zusammenstellung von in der Natur verbreiteten Schwermetallhyperakkumulierenden Pflanzen (verändert nach Baker & Brooks, 1989).

Pflanzenart	Pflanzenfamilie	hyperakkumuliertes Metall
<i>Aeollanthus biformifolius</i>	Lamiaceae	Cu, Co
<i>Alyssum lesbiacum</i>	Brassicaceae	Ni
<i>Arabidopsis halleri</i> ssp. <i>halleri</i>	Brassicaceae	Zn, Cd
<i>Armeria maritima</i>	Plumbaginaceae	Pb
<i>Crotalaria cobalticola</i>	Fabaceae	Co
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae	Zn
<i>Viola calaminaria</i>	Violaceae	Zn

Über die molekularen Mechanismen, die hinter dem Phänomen der Hyperakkumulation stehen, ist bis heute nur sehr wenig bekannt. Untersuchungen an der Nickel-hyperakkumulierenden Pflanze *Alyssum lesbiacum* ergaben, daß die Akkumulation mit der Komplexierung von Nickel durch Histidin zusammenhängt. Weitere Experimente konnten darüber hinaus zeigen, daß durch die externe Zugabe von Histidin die Nickeltoleranz bzw. –akkumulation der nichthyperakkumulierenden Art *Alyssum montanum* gesteigert werden kann (Krämer *et al.*, 1996). Vergleichende Experimente zwischen *Thlaspi caerulescens* (Zink-Hyperakkumulierer) und *Thlaspi arvense* (Nicht-Akkumulierer) zeigten, daß beim Hyperakkumulierer eine erhöhte Aufnahme rate in die Wurzel gemessen werden konnte (Lasat *et al.*, 1998). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, daß bei *Thlaspi caerulescens* nach 96 Stunden die zehnfache Menge an Zink in den Sproß transportiert wurde. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Hyperakkumulationsphänotyp auf einer Kombination zwischen gesteigerter Aufnahme in die Wurzel und effektiverer Translokation in den Sproß beruht.

1.8 Phytoremediation

Die Untersuchungen an metallhyperakkumulierenden Pflanzen sind nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht interessant, sondern tragen auch das Potential für eine technische Anwendung in sich. Dies liegt darin begründet, daß hyperakkumulierende Pflanzen prinzipiell für die Phytoremediation kontaminierter Böden eingesetzt werden können (Chaney *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 2002a). Unter Phytoremediation versteht man die Verwendung von Pflanzen zur Entfernung oder Entgiftung von Kontaminationen der Umwelt (Krämer & Chardonnens, 2001). Generell kann man sechs verschiedene Arten der Phytoremediation unterscheiden (Salt *et al.*, 1998):

- Phytodegradation (Abbau organischer Schadstoffe durch Pflanzen und assoziierte Mikroorganismen)
- Phytostabilisierung (Reduzierung der Bioverfügbarkeit)
- Rhizofiltration (Aufnahme und Akkumulation von Schadstoffen in den Wurzeln)
- Phytovolatilisation (Verwendung von Pflanzen, um Schadstoffe zu verflüchtigen)
- Phytoextraktion (Aufnahme von Schadstoffen und deren Konzentration in erntefähigen Pflanzenteilen)
- Entfernung von Schadstoffen aus der Luft

In der Praxis kommt das Prinzip der Phytoextraktion – neben der Phytostabilisierung – am häufigsten zum Einsatz. Bei dieser Methode kann man wiederum zwei unterschiedliche Vorgehensweisen unterscheiden. Die induzierte und die kontinuierliche Phytoextraktion (Salt *et al.*, 1998). Bei der induzierten Phytoextraktion von Schwermetallen werden Pflanzen verwendet, die keinen natürlichen Hyperakkumulationsphänotyp zeigen. Nachdem die Pflanzen eine große Biomasse gebildet haben, werden dem Boden chelatierende Substanzen (z.B. EDTA) zugesetzt, die zur Folge haben, daß die Pflanzen die chelatierten Metallionen vermehrt aufnehmen und speichern. Bei der kontinuierlichen Phytoextraktion von Schwermetallen werden Pflanzen verwendet, die natürlicherweise Metalle akkumulieren. Bei dieser Methode müssen keine zusätzlichen Chemikalien ausgebracht werden, da die Pflanzen von sich aus die Metalle aus dem Boden mobilisieren. Ein weiterer Vorteil liegt dabei in der Tatsache, daß die Aufnahme der Metalle über die gesamte Wachstumsperiode erfolgt.

Im Gegensatz zur konventionellen Bodenreinigung ist die Phytoremediation eine sehr preiswerte und umweltschonende Alternative. Allerdings gibt es noch eine Reihe von Problemen, die eine großflächige Anwendung verhindern. Zum einen ist die Verwendung von Chelatoren in vielen Ländern verboten, da sie fast ausschließlich toxisch sind und somit das Grundwasser verseuchen könnten. Die natürlich vorkommenden Hyperakkumulierer haben aber in der Regel nur eine sehr geringe Biomasseproduktion, was eine effektive Säuberung des Bodens erschwert. Um diesem Dilemma zu entkommen, wäre es nötig, Pflanzen mit einer großen Biomasseproduktion gentechnisch so zu verändern, daß sie eine höhere Akkumulationsrate erreichen. Erste Versuche auf diesem Gebiet, die aber zu keinem befriedigenden Resultat führten, wurden bereits unternommen (Song *et al.*, 2003). Der Kern des Problem liegt darin, daß heutzutage das Wissen über die Mechanismen der Schwermetallhomöostase noch zu gering ist, um effektive „Extraktionspflanzen“ gentechnisch zu erzeugen (Clemens *et al.*, 2002a).

1.9 *Arabidopsis halleri* als Modellpflanze

Arabidopsis halleri (L.) O'Kane and Al-Shehbaz ssp. *halleri* ist ein Metallophyt, der hypertolerant gegenüber Zink und Cadmium ist (Baker & Brooks, 1989; Macnair *et al.*, 1999). Darüber hinaus besitzt die Pflanze die Fähigkeit, Zink und Cadmium im Sproß zu hyperakkumulieren (Küpper *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). In hydroponischen Experimenten konnte gezeigt werden, daß *A. halleri*-Pflanzen eine Zn^{2+} -Konzentration von 1000 μM ohne Probleme verkraften. Unter diesen Bedingungen kam es im Sproß zu einer Zinkakkumulation von bis zu 30 mg pro g Trockengewicht (Zhao *et al.*, 2000). Lokalisationsstudien mittels EDXA (Energy Dispersive X-ray Analysis) zeigten, daß Zink und Cadmium hauptsächlich in den Mesophyllzellen der Blätter akkumulieren (Küpper *et al.*, 2000).

Über die molekularen Mechanismen der Hyperakkumulation ist bisher noch wenig bekannt. Arbeiten von Zhao *et al.* (2000) konnten zwar zeigen, daß bei Zinkstreß eine erhöhte Citrat- und Malat-Konzentration in den Wurzeln von *A. halleri* zu messen ist, aber ein direkter Zusammenhang mit der Hyperakkumulation von Zink konnte nicht hergestellt werden.

Neben dem Hyperakkumulationsphänotyp hat *A. halleri* noch eine weitere interessante Eigenschaft. Sie ist sehr nahe mit *Arabidopsis thaliana* verwandt (Koch *et al.*, 1999), der am besten untersuchten Modellpflanze überhaupt. Die Sequenzierung zahlreicher ESTs (Expressed Sequence Tags) von *A. halleri* hat darüber hinaus ergeben, daß beide Arten auf der Ebene der mRNA eine Ähnlichkeit von ca. 94 % aufweisen (Vess, 2003). Somit ist es möglich, über den Vergleich mit dem vollständig sequenzierten Genom von *A. thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) Aussagen zu möglichen Funktionen isolierter Gene oder Genfragmente aus *A. halleri* zu machen. Des Weiteren können Gene aus *A. halleri* relativ problemlos in *A. thaliana* mit Hilfe der gut etablierten molekularbiologischen Techniken auf ihre Funktion hin untersucht werden.

Die hier aufgeführten Vorzüge machen deutlich, daß *A. halleri* eine sehr gut geeignete Modellpflanze für die Untersuchung von molekularen Mechanismen der Metallhomöostase ist.

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Das erste Hauptziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die in Zusammenhang mit der Metallhyperakkumulation in Pflanzen stehen. Zu Beginn der Arbeit war über die verschiedenen molekularen Mechanismen dieses Phänomens nur sehr wenig bekannt (Clemens, 2001). Untersuchungen am Metallhyperakkumulierer *Thlaspi caerulescens* führten zur Identifizierung der ersten Zinktransporter ZNT1, ZNT2 bzw. ZTP1 die im Zusammenhang mit dem Zinkhyperakkumulationsphänotyp stehen sollen (Assuncao *et al.*, 2000; Pence *et al.*, 2000). In Bezug auf *A. halleri* – ebenfalls ein Zink- und Cadmiumhyperakkumulierer – gab es eine Reihe physiologischer Experimente, die sich mit der Metallaufnahme und Kompartimentierung in der Pflanze beschäftigten (Macnair *et al.*, 1999; Bert *et al.*, 2000; Küpper *et al.*, 2000). Allerdings konnten bis dato keine molekularen Mechanismen identifiziert werden, die in Zusammenhang mit der Hyperakkumulation stehen. Aus diesem Grund sollten die beiden Pflanzen *A. thaliana* und *A. halleri* auf Transkriptebene verglichen werden. Diese Strategie wurde gewählt, da beide Arten auf der einen Seite sehr nahe verwandt sind (Koch *et al.*, 1999), sich aber auf der anderen Seite in ihrer Fähigkeit, Zink und Cadmium zu akkumulieren, stark unterscheiden (Küpper *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Differentiell exprimierte Gene sollten deshalb einen Hinweis darauf geben, welche

Faktoren eine wichtige Rolle bei der Schwermetallakkumulation spielen. Für die Analyse des Transkriptoms sollten „Arabidopsis genome arrays“ (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet werden, weil dieses System für *A. thaliana* bereits gut etabliert war. Da es aber keine Hinweise gab, daß diese Technologie auch für *A. halleri* zu verwenden ist, musste zu Beginn getestet werden, ob es wirklich möglich ist, verwandte Arten mit Hilfe dieser Technologie zu vergleichen. In diesem Fall sollten Pflanzen unter Kontrollbedingungen (d.h. ohne Schwermetallstreß) angezogen und analysiert werden. Die Bedingungen wurden so gewählt, da es Hinweise in der Literatur gab, daß der Hyperakkumulationsphänotyp von *A. halleri* ein konstitutiv ausgeprägtes Merkmal ist (Bert *et al.*, 2002; Macnair *et al.*, 2002). Des weiteren sollte der Hauptfokus auf das Wurzelgewebe gelegt werden, da dies den Ort des ersten Kontaktes darstellt. Ein weiterer Grund für diese Fokussierung ist darin zu sehen, daß Chaney *et al.* (1997) postulierten, daß ein Hyperakkumulationsphänotyp auf der erhöhten Aufnahme und einer gesteigerten Translokation in Richtung Sproß zurückzuführen ist – beides Prozesse, die in der Wurzel ablaufen.

Das zweite Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die in der Metallhomöostase von Pflanzen eine wichtige Rolle spielen. Zu diesem Zweck sollten über verschiedene Screeningverfahren metallregulierte Gene bzw. Proteine identifiziert werden. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf Genen, die an der transkriptionellen Antwort auf Schwermetallüberschuß bzw. -defizienz beteiligt sein könnten. Hierfür wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen sollte mittels cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) nach Genen gesucht werden, die in *A. halleri*-Pflanzen unter Schwermetallstreß induziert bzw. reprimiert werden. Für die Streßbehandlung wurde ein Cocktail aus zwei essentiellen (Zink und Kupfer) und einem nicht-essentiellen Schwermetall (Cadmium) gewählt. Diese Kombination sollte es ermöglichen, in einem Experiment sowohl Gene zu identifizieren, die in der Metallhomöostase eine Rolle spielen, als auch Gene, die bei der Detoxifizierung von Schwermetallen wichtig sind. Anschließend wollte man mittels RT-PCR-Analysen klären, ob das Expressionsmuster dieser Gene ausschließlich durch ein einziges Metall verändert wird, oder ob es sich um eine generelle Antwort handelt. Parallel zur Untersuchung des Transkriptoms sollte auch auf Proteinebene nach metallresponsiven Genen gesucht werden. Zu diesem Zweck sollten 2D-Gele mit löslichen Proteinen aus Wurzeln von *A. halleri* erstellt werden, die mit verschiedenen Konzentrationen an Cadmium gestreßt wurden. Im Anschluß daran beabsichtigte man, diese Ergebnisse mit bereits vorhandenen Daten von *A. thaliana* (Roth & Clemens, unveröffentlicht) zu vergleichen. Da im Laufe der Arbeit die Technologie der „Arabidopsis genome arrays“ (= Affymetrix-Microarrays) verfügbar wurde, sollten mit dieser Methode ebenfalls Transkriptomanalysen durchgeführt werden. Im Gegensatz zum cDNA-AFLP sollten die Pflanzen bei diesen Experimenten jedoch nur mit einem Metall gestreßt werden. Für die Behandlungen wurde sowohl ein essentielles (Kupfer), als auch ein nicht essentielles Schwermetall (Cadmium) gewählt. Darüber hinaus sollte auch die Wirkung von subtoxischen und toxischen Cadmiumkonzentrationen auf die Pflanze untersucht und verglichen werden. Wie auch beim konstitutiven Vergleich lag das Hauptaugenmerk hierbei auf den Vorgängen in der Wurzel.

Im Anschluß an die Identifizierung interessanter Kandidatengene war deren nähere Charakterisierung geplant. Mittels RT-PCR, *Northern*- oder *Western*-Blot sollten die Expression bzw. Translation unter verschiedenen Metallangeboten analysiert werden. Darüber

hinaus sollten Knockout-Pflanzen auf eine veränderte Metalltoleranz hin untersucht werden. Um vorhergesagte Transportaktivitäten von putativen Transportern zu überprüfen, war angedacht, diese heterolog in Hefe zu exprimieren. Eine weitere Methode der Charakterisierung sollte die Überexpression einzelner Gene in *A. thaliana* darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide

Alle verwendeten Feinchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht in Tabelle 2 aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien und deren Bezugsquellen

Material	Lieferfirma
Acrylamid, Bisacrylamid	Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
Monoklonaler Antikörper HA.11	BabCO, Richmond, USA
YNB, Drop-out Supplement Mix	BIO 101 Inc., Carlsbad, USA
SeaKem™ LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Yeast Extract	DIFCO, Detroit, USA
Adenin, Leucin, Uracil, Tryptophan	Fluka, Buchs, Schweiz
Duracryl	Genomic Solutions, Ann Arbor, USA
dNTP-Set, Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase,	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen NEB, Frankfurt am Main
Anti Mouse IgG, T4-DNA-Ligase, <i>Pfu</i> - und <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
Oligonukleotide	Sigma-Genosys, Darmstadt
Sequenzierprimer	MWG, Ebersberg bei München
Superscript II Reverse Transkriptase, second strand buffer, DNA-Ligase, DNA Polymerase I, Ribonuklease H, T4-DNA Polymerase, acetyliertes BSA 1st strand Synthesis kit	Invitrogen, Karlsruhe
MegaScript T7 Kit	Ambion, Huntingdon, UK
Biotin-16-UTP	Roche, Mannheim
Biotin-11-CTP	Loxo, Dossenheim
SAPE	Moleculare Probes, Karlsruhe
Anti-streptavidin Antikörper	Linaris, Wertheim - Bettingen
α [³² P]-dATP, γ [³³ P]-ATP	ICN, Pharmaceuticals, USA

2.1.2 Nährmedien

Alle Medien für Mikroorganismen wurden autoklaviert (121 °C, 2x10⁵ hPa, 20 min). Bei Bedarf wurden dem Medium - nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C - die benötigten Antibiotika zugesetzt.

Tabelle 3: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung (alle Angaben pro Liter)	Kulturmedium für
LB	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, (15 g Agar)	Bakterien
YEP	10 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
EMM	3 g Kaliumhydrogenphthalat, 2,2 g Na ₂ HPO ₄ , 5 g NH ₄ Cl, 20 g Glukose, 1,05 g MgCl ₂ , 1 g KCl, 0,04 g Na ₂ SO ₄ , 14,7 mg CaCl ₂ , 1 mg Pantothen säure, 10 mg Nicotinsäure, 10 mg Inositol, 10 mg Biotin, 0,5 mg Borsäure, 1 mg Citrat, 0,4 mg MnSO ₄ , 0,4 mg ZnSO ₄ , 0,2 mg FeCl ₂ , 0,1 mg KI, 0,04 mg Molybdänsäure, 0,04 mg CuSO ₄ , 250 mg Adenin, 180 mg Tryptophan, 180 mg Uracil, 180 mg Leucin, 180 mg Histidin, (20 g Agar)	<i>S. pombe</i>

Bezeichnung	Zusammensetzung (alle Angaben pro Liter)	Kulturmedium für
YNB	1,7 g YNB ohne NH ₂ SO ₄ , 5 g NH ₂ SO ₄ , 20 g Glukose, 0,8 g Drop-out Supplement Mix, 20 mg Leucin, 20 mg Histidin, 20 mg Tryptophan, 20 mg Uracil, (20 g Agar)	<i>S. cerevisiae</i>
NZM	1,7 g YNB ohne NH ₂ SO ₄ , 5 g NH ₂ SO ₄ , 10 g Galactose, 10 g Saccharose, 0,8 g Drop-out Supplement Mix, 20 mg Adenin, 20 mg Leucin, 20 mg Histidin, 20 mg Tryptophan, 10 µM FeCl ₃ in 0,1 M HCl, pH 4,2 mit 20 mM Na-Citrat,	<i>S. cerevisiae</i>
YPD	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, 20 g Glukose, (20 g Agar)	<i>S. cerevisiae</i>
YPDA	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, 20 g Glukose, 30 mg Adenin, (20 g Agar)	<i>S. cerevisiae</i>
Hoagland	Makroelemente: 66 mg Ca(NO ₃) ₂ , 12 mg NH ₂ PO ₄ , 49 mg MgSO ₄ , 49 mg KNO ₃ , Mikroelemente: 7,5 µg CuSO ₄ , 23 µg ZnSO ₄ , 81 µg MnCl ₂ , 284 µg H ₃ BO ₃ , 1,4 µg MoO ₃ , Eisen-Chelat Komplex: 1,25 ml Fe-HBED (Chaney, 1988), pH 5,7	<i>A. thaliana</i> <i>A. halleri</i>
MS	Makroelemente: 1,9 g KNO ₃ , 1,65 g HH ₄ NO ₃ , 0,44 g CaCl ₂ , 0,37 g MgSO ₄ , 0,17 g KH ₂ PO ₄ Eisen-EDTA: 27,8 mg FeSO ₄ , 37,7 mg Na ₂ EDTA Mikroelemente: 19,9 mg MnSO ₄ , 8,6 mg ZnSO ₄ , 6,3 mg H ₃ BO ₃ , 0,83 mg KJ, 0,25 mg Na ₂ MoO 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	<i>A. halleri</i>

Tabelle 3 fortgesetzt

2.1.3 Mikroorganismen und Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Hefe- und Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz/Herkunft
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
DY 1457	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3</i>	Zhao & Eide, 1996a
<i>zhy3</i>	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3</i>	Zhao & Eide, 1996b
<i>Escherichia coli</i>		
DH 10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> Δ <i>rpsL nupG</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
GV3101	Gm ^r , Rif ^r	Koncz & Schell, (1986)

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Referenz/Herkunft
pGEM-T	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , SP6- und T7-Promotor	Promega, Madison, USA
pSGP72	C-term. Triple HA-Tag, <i>Leu2</i> Amp ^r	Dr. Susan Forsburg, Salk Institute, La Jolla, CA, USA
pCB302	RK2 ori, <i>nptIII</i> , MCS1, MCS2, T _{nos} -Promotor-bar-P _{nos} -Terminator	Xiang <i>et al.</i> , 1999
pYES2	GAL Promotor, URA3, Amp ^r ,	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	<i>lacZ</i> , SP6-Promotor, Amp ^r	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Kultivierung von Bakterien und Hefen

2.2.1 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* DH10B-Zellen erfolgte bei 37 °C in LB-Medium oder auf LB-Platten unter Zugabe von 100 mg/l Ampicillin bzw. 50 mg/l Kanamycin. Flüssigkulturen wurden bei 160 U/min geschüttelt.

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Die Kultivierung der Agrobakterien erfolgte bei 28 °C in LB-Medium oder auf LB-Platten unter Zugabe von 50 mg/l Rifampicin und 25 mg/l Gentamycin. Nach erfolgter Transformation wurden zusätzlich 50 mg/l Kanamycin dem Medium zugesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 160 U/min geschüttelt.

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*

Alle Hefe-Stämme wurden bei 30 °C kultiviert. Für *Saccharomyces cerevisiae* Stämme wurde YNB- oder YPDA-Medium bzw. Platten verwendet, wohingegen für *Schizosaccharomyces pombe* EMM- oder YE-Medium bzw. Platten zum Einsatz kamen. Den beiden Minimalmedien (YNB bzw. EMM) wurden je nach Bedarf die benötigten essentiellen Aminosäuren Histidin, Leucin, Uracil bzw. Tryptophan zugesetzt.

2.3 Pflanzenanzucht und Streßbehandlung

2.3.1 Oberflächensterilisation

Samen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen (Ökotyp "Columbia") wurden für zwei Minuten in 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer 12 %igen (w/v) Natriumhypochlorid Lösung, der 0,05 % TWEEN 20 zugesetzt wurden, für ca. 10 Minuten sterilisiert.

2.3.2 Kultivierung in Erde

2.3.2.1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Samen von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp bzw. Mutanten) wurden auf feuchter Erde ausgelegt und über Nacht bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden sie für 2-3 Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht /16 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit) angezogen und anschließend in Töpfe mit 5 cm Durchmesser vereinzelt. In den nächsten 2-3 Wochen wurden sie ebenfalls unter Kurztagbedingungen kultiviert und bei Bedarf anschließend unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C) bis zur Samenreife kultiviert.

2.3.2.2 *Arabidopsis halleri* (L.) O`Kane & Al-Shehbaz

Stecklinge von adulten Pflanzen wurden in Erde überführt und bei 100 % Luftfeuchtigkeit und Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit) bewurzelt. Nach der erfolgreichen Bewurzelung wurden die Stecklinge in Töpfe mit 8 cm Durchmesser umgetopft.

2.3.3 Kultivierung in Flüssigmedium (= Schüttelkultur)

Samen von *Arabidopsis halleri* (L.) O`Kane & Al-Shehbaz wurden oberflächensterilisiert (vgl. 2.3.1) und in MS Medium für 2 Wochen unter Dauerlicht und Schütteln (50 U/min) kultiviert. Mehrere Kolben wurden mit einer Mixtur verschiedener Schwermetalle (100 μ M CdCl₂, 500 μ M CuSO₄, 500 μ M ZnCl₂) gestreßt. Nach 2, 8 und 24 Stunden wurden die kompletten Pflanzen geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung des Pflanzenmaterials erfolgte bei -70 °C.

2.3.4 Kultivierung im hydroponischen System

2.3.4.1 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Die Samen wurden wie unter 2.3.1 beschrieben sterilisiert und anschließend auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße, die mit 0,5 %igem (w/v) Wasseragar befüllt waren, vereinzelt. Um eine kontinuierliche Nährstoffversorgung zu gewährleisten wurden die Gefäße an der Basis abgeschnitten und in Hoaglandlösung gestellt. Nach drei bis vier Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht /16 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C) und bei 100 % Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen in 1,5-Liter-Töpfe mit Hoaglandlösung transferiert. Das Heranwachsen der Pflanzen bis zur geeigneten Größe erfolgte ebenfalls unter Kurztagbedingungen, jedoch wurde die Luftfeuchtigkeit auf 60 % reduziert.

2.3.4.2 *Arabidopsis halleri* (L.) O`Kane & Al-Shehbaz

Stecklinge von adulten Pflanzen wurden für ein bis zwei Wochen bei 100 % Luftfeuchtigkeit in Hoaglandlösung kultiviert. Die bewurzelten Stecklinge wurden anschließend in 1,5-Liter-Töpfe mit Hoaglandmedium überführt und die Luftfeuchtigkeit wurde auf 60 % reduziert. Während der gesamten Zeit wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht /8 h Dunkelheit – Zyklus, 22 °C) kultiviert.

2.3.5 „detached leaves“-Experimente (verändert nach Ichimura *et al.*, 2000)

Je Behandlung wurden zwei bis drei junge Blätter mit einer Rasierklinge an der Basis des Stiels abgetrennt und für 24 Stunden in MES-Puffer Lösung (pH 5,7) inkubiert. Danach wurden die Blätter vorsichtig in neue MES-Lösungen transferiert, denen zuvor verschiedene Schwermetalle bzw. H₂O₂ zugegeben wurde. Die Blätter wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.6 Streßbehandlung von hydroponischen Kulturen

Nachdem 24 Stunden vor der Streßbehandlung das Medium der Pflanzen erneuert wurde, erfolgte die Streßbehandlung durch Umsetzen der Pflanzen in neue Töpfe mit 1,5 Liter Hoagland-Medium, in das verschiedene Schwermetalle in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 6) bzw. H₂O₂ gegeben wurden. Nach zwei Stunden wurden die Wurzeln geerntet und die Proben, die für Transkriptomanalysen bestimmt waren, wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben für die AAS-Analysen wurden zuerst gewaschen (siehe 2.6.1.1) und dann getrocknet oder im Falle der Sproßproben sofort getrocknet.

Bei den Langzeit-Experimenten wurden die Pflanzen in zinkfreiem, normalem und mit 30 μ M ZnSO₄ angereichertem Hoagland-Medium für eine Woche kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit

wurden die Wurzeln und der Sproß der Pflanzen geerntet und wie oben beschrieben eingefroren oder getrocknet.

Tabelle 6: Zusammenstellung der verschiedenen Behandlungen der hydroponischen Kulturen und der danach durchgeführten Analysen

Metall bzw. H ₂ O ₂	<i>A. thaliana</i>	Art der Analyse	<i>A. halleri</i>	Art der Analyse
H ₂ O ₂	5 mM	RT-PCR	5 mM	RT-PCR
Cd ²⁺	10 µM	AAS / RT-PCR Microarray	10 µM	AAS
	25 µM	AAS	25 µM	AAS / RT-PCR Microarray
	50 µM	RT-PCR / Microarray	125 µM	RT-PCR / Microarray
Zn ²⁺	50 µM	RT-PCR	125 µM	RT-PCR
Cu ²⁺	10 µM	AAS / RT-PCR Microarray	10 µM	AAS / RT-PCR Microarray
			25 µM	RT-PCR

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Standardmethoden

Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophoresen, die Dephosphorylierung von Vektoren mittels alkalischer Phosphatase, RNA- bzw. DNA-Fällung, Ligationen und die Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1998) durchgeführt.

Plasmid-Präparation (mini bzw. midi), Aufreinigung von PCR-Produkten und die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch QIAGEN-Kits gemäß den Herstellerangaben.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden PE9700- (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und „DNA Engine PTC-200“-„Thermocycler“ (MJ Research, USA) eingesetzt. Als Matrize wurden Plasmid-DNA, cDNA, genomische DNA oder Bakterienkolonien verwendet. Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50 µl und beinhaltete neben der Matrizen-DNA/RNA folgende Komponenten: je 1 µl 20 µM spezifische Oligonukleotide (siehe Anhang), 1 µl 20 mM dNTP-Mix, 5 µl 10xPCR-Reaktionspuffer (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1 % (v/v) TritonX-100; 15 mM MgCl₂) 1-5 U *Taq*-DNA Polymerase (Promega, USA). Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten für eine funktionelle Expression wurde alternativ eine *pfu*-DNA Polymerase (Promega, USA) verwendet. Um eine optimale Effizienz zu erzielen, wurde bei diesen Reaktionen ebenfalls ein anderer 10x Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄; 1,0 % (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml nukleasefreies BSA) verwendet.

2.4.3 RNA-Isolation

Das Pflanzengewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. 200-300 mg pulverisiertes Gewebe wurde mit 1 ml TRIZOL[®] versetzt und für 2 Minuten stark geschüttelt. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben erneut für 2 Minuten stark geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe für 30 Sekunden heftig

gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden die Proben (12 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Durch mehrmaliges Umdrehen des Gefäßes wurden die Lösungen vermischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurden die RNA durch erneutes Zentrifugieren (12 000 U/min, 4 °C, 10 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) pelletiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Nach dem erneuten Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in 20 µl RNasefreiem Wasser aufgenommen und 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Zur Quantifizierung und Qualitätsprüfung der RNA wurde die Absorption bei 260 nm bzw. 280 nm gemessen. Um sicher zu stellen, daß die RNA nicht degradiert war, wurde 1 µg Gesamt-RNA auf einem 1 %igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt.

2.4.4 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen für PCR-Reaktionen

Zwei bis drei junge Blätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl; 1,5 % [w/v] SDS; 0,5 % [v/v] β-Mercaptoethanol) versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 65 °C wurden die Proben mit 300 µl einer Kaliumacetat-Lösungen (60 % [v/v] 5 M Kaliumacetat; 11,5 % [v/v] Eisessig) gründlich vermischt und für 10 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14 000 U/min, 4 °C, 10 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt und mit 800 µl PCI, pH 8,0 vermischt. Nach erneuter Zentrifugation (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach dem Pelletieren (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) der genomischen DNA wurde diese mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft vollständig getrocknet. Das trockene Pellet wurde dann in 40 µl Wasser resuspendiert.

2.4.5 Isolation genomischer DNA für Southern-Blot Analysen

1g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 7 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 % [w/v] SDS; 10 mM β-Mercaptoethanol) versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei 65 °C wurden dem Ansatz 2,5 ml Kaliumacetat-Lösung (60 % [v/v] 5 M Kaliumacetat; 11,5 % [v/v] Eisessig) zugegeben. Nach dem Mischen durch mehrmaliges Umdrehen der Gefäße wurde der Ansatz für mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf) wurde der Überstand durch eine Miracloth-Membran gefiltert und mit 5 ml Isopropanol vermischt. Nach dem gründlichen Mischen des Ansatzes durch Invertieren wurde die genomische DNA pelletiert (5 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf). Anschließend wurde das Pellet mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach dem Lösen des Pellets in 200 µl Wasser wurden 1,5 µl 1 %ige (w/v) RNA-Lösung zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNA durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat und 220 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem [v/v] Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30 µl Wasser resuspendiert.

2.4.6 Northern-Transfer

Für den *Northern*-Transfer wurden 10 µg Gesamt-RNA über denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.4.1). Anschließend wurde das Gel zweimal für 20 min mit Wasser gewaschen und danach für 20 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) Lösung äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Bioscience, Freiburg) erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht. Als Transferpuffer diente 20x SSC. Nach Beendigung des Transfers wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

2.4.7 Southern-Transfer

Für den *Southern*-Transfer wurden 20 µg genomische DNA mittels Restriktionsendonukleasen vollständig gespalten und über ein 0,8 %iges (w/v) nichtdenaturierendes Agarosegel (siehe 2.4.1) aufgetrennt. Im Anschluß an die Auftrennung wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen und anschließend für 30 Minuten in 0,25 M HCl-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem das Gel erneut mit Wasser gewaschen wurde, erfolgten zwei zwanzigminütige Inkubationen in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH). Anschließend wurde das Gel sooft in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; pH 7,0) gewaschen, bis der pH-Wert der Lösung nach der Inkubation unter 9,0 lag. Der Transfer der genomischen DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte mittels Kapillarblot über Nacht. Als Transferlösung diente 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0). Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde sie mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker™ 1800, Stratagene, Heidelberg).

2.4.8 Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten

Um radioaktive DNA-Sonden herzustellen, wurden 25-50 ng gereinigtes DNA-Fragment (siehe 2.4.1) mit 50 µCi α -[³²P]-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.

2.4.9 Radioaktive Hybridisierung

Alle Schritte der Hybridisierung erfolgten unter ständiger Rotation in Hybridisierungsöfen. Zu Beginn wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre transferiert und für mindestens 2 Stunden mit Church-Puffer (0,5 M NaHPO₄; 1 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS; pH 7,2) bei 65 °C prähybridisiert. Anschließend wurde der Church-Puffer durch neuen Puffer ersetzt und die radioaktiv markierte Sonde (siehe 2.4.8) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht und wurde bei einer Temperatur zwischen 58 °C und 65 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran einmal mit 2x SSC für 5 Minuten bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte ein zweiter Waschschriff für 20 min mit Waschlösung (0,1x SSC; 0,1 % (w/v) SDS), der sooft wiederholt wurde, bis die detektierte Radioaktivität einen angemessenen Wert erreicht hatte. Der zweite Waschschriff wurde - je nach Experiment - bei Temperaturen zwischen 45 °C und 65 °C durchgeführt. Die Membran wurde anschließend für mindestens einen Tag auf einen Phosphoscreen (Amersham Bioscience, Freiburg) gelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem Phosphorimager (Storm™, Amersham Biosciences, Freiburg).

2.4.10 RT-PCR

Als Matrize für die RT-PCR Reaktion diente 1 µl cDNA, die mit Hilfe des „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ (MBI Fermentas, St Leon-Roth) oder dem „SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe) synthetisiert wurde. Für die Synthesereaktion wurden 1 µg Gesamt-RNA verwendet, die zuvor mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt wurde. Sowohl die cDNA-Synthese als auch die DNase-Behandlung wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.11 RACE (Rapid Amplification of CDNA Ends)

Für die Synthese der „5'-RACE ready cDNA“ und 3'-RACE ready cDNA“ wurde 1 µg Gesamt-RNA verwendet (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, Palo Alto, USA). Die Produkte dieser Reaktionen wurden vor der RACE-PCR mit Tricine-EDTA Puffer (10 mM Tricine-KOH, pH 8,5; 1 mM EDTA) 1:10 verdünnt. Alle Schritte wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.12 Quantitative real-time PCR

Zu Beginn wurden 1,5 µg Gesamt-RNA mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des „SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Karlsruhe) eine cDNA synthetisiert, die im Anschluß 1:50 mit Wasser verdünnt wurde. Die PCR-Reaktion wurde mit dem ABI Prism® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Jede Probe wurde aus technischen Gründen als Triplikat analysiert und hatte folgende Zusammensetzung: 10 µl SYBR® Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 5 µl cDNA, 5 µl Primer-Mix (0,5 µM je Primer). Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Programms ABI Prism® 7000 SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet. Hierbei wurden alle Parameter gemäß der Voreinstellung übernommen und der CT-Wert wurde über die Funktion auto-CT ermittelt. Für jede Probe wurde anschließend der Δ CT-Wert berechnet (Δ CT = CT_(Kandidatengen) - CT_(konstitutive Kontrolle)). Danach wurde darauf basierend der $\Delta\Delta$ CT bestimmt ($\Delta\Delta$ CT = Δ CT_{Behandlung} - Δ CT_{Kontrolle}). Schlußendlich wurde die relative Transkripthäufigkeit nach der folgenden Formel berechnet: relative Transkripthäufigkeit = $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

2.4.13 Agrobakterien-Transformation

Eine Einzelkolonie von *Agrobacterium tumefaciens* wurde über Nacht in selektivem LB-Medium bei 28 °C und 200 U/min angezogen. Mit dieser Kultur wurden 50 ml selektives LB-Medium angeimpft. Nachdem die Hauptkultur eine optische Dichte von 0,5-1,0 erreicht hatte, wurde sie auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (3 500 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf). Das Pellet wurde dann in 1 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und Aliquots von 100 µl auf vorgekühlte Eppis verteilt, die anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Nach dem Auftauen der Zellen wurde 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Zellen bei 28 °C und leichtem Schütteln für 2-4 Stunden inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (6 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurden die Zellen in 75 µl LB-Medium resuspendiert, auf selektive LB-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C kultiviert.

2.4.14 Pflanzentransformation

Eine 400 ml Übernachtkultur (28 °C, 200 U/min) von *Agrobacterium tumefaciens* in selektivem YEP-Medium wurde zentrifugiert und in 900 ml 5 % (w/v) Saccharoselösung resuspendiert. Nachdem zusätzlich 180 µl Silwet-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA) zugegeben wurden, wurde die Infloreszenz von ca. 6 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen in diese Suspension mehrmals eingetaucht. Nachdem die Pflanzen über Nacht in Dunkelheit gehalten wurden, erfolgte der Transfer ins Gewächshaus, wo die Pflanzen bis zur Samenreife kultiviert wurden. Die reifen Samen wurden auf gedämpfte Erde ausgebracht und für ein bis mehrere Tage bei 4 °C stratifiziert. Nach der Keimung der Samen wurden die drei bis vier Tage alten Pflanzen mit 0,1 %iger (v/v) Basta-Lösung besprüht. Diese Prozedur wurde im Abstand von 2-3 Tagen zweimal wiederholt.

2.4.15 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Mit 5 ml einer Übernachtkultur wurden 100 ml YPD-Medium angeimpft. Nachdem die Zellen eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 erreicht hatten, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf) geerntet. Die Zellen wurden mit 20 ml Lösung A (10 mM BICINE; 1 M Sorbitol; 3 % (v/v) Ethylenglykol; pH 8,35) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf). Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Lösung A aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -70 °C eingefroren. Nach frühestens 30 Minuten wurden die Zellen wieder auf RT gebracht und mit 1 µg Plasmid-DNA und 50 µg Heringsspema-DNA versetzt. Nachdem der gesamte Ansatz für 5 min bei 30 °C inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 1 ml Lösung B (200 mM BICINE; 40 % (v/v) PEG 1000; pH 8,35). Daraufhin wurden die Hefezellen für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (3 000 U/min, RT, 2 min, Centrifuge 5415 D, Eppendorf) und die Zellen in 800 µl Lösung C (10 mM BICINE; 150 mM NaCl; pH 8,35) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend auf selektiven YNB-Platten ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 30 °C waren Koloniebildungen zu beobachten.

2.4.16 Hefe-Wachstums-Test

Die verschiedenen *Saccharomyces cerevisiae* Stämme wurden über Nacht in selektivem NZM-Medium angezogen (150 U/min, 30 °C). Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Kulturen photometrisch bei 600 nm bestimmt. Anschließend wurden die verschiedenen Ansätze so verdünnt, daß eine Start-OD von 0,05 erreicht wurde. Während des Wachstumsversuches wurden die Zellen in NZM-Medium kultiviert, dem verschiedene Konzentrationen ZnSO₄ zugesetzt wurden. Nach ca. 24 Stunden bei 30 °C und 150 U/min wurde die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm bestimmt.

2.4.17 cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

2.4.17.1 Gesamt- und m-RNA Isolation

Aus *Arabidopsis halleri* Pflanzen (L.) O`Kane & Al-Shehbaz, die für 0 (= Kontrolle), 2, 8 und 24 Stunden mit einer Mixtur aus verschiedenen Schwermetallen (100 µM CdCl₂, 500 µM CuSO₄, 500 µM ZnCl₂) behandelt wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.4.3). Im Anschluß wurden aus 150 µg Gesamt-RNA mit Hilfe des „Dynabeads mRNA purification

Kits“ (DYNAL Biotech GmbH, Hamburg) laut Herstellerprotokoll m-RNA isoliert. Am Ende wurde die m-RNA in 10 µl Tris/HCl (DYNAL Biotech GmbH, Hamburg) aufgenommen.

2.4.17.2 cDNA Synthese

Die gesamte eluierte m-RNA wurde für die Erststrangsynthese verwendet. Das Umschreiben der m-RNA in cDNA wurde laut Herstellerangaben durchgeführt (1st strand Synthesis kit, GibcoBRL). Nach Beendigung der Erststrangsynthese wurde die cDNA für 15 Minuten mit RNase H (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Anschließend wurden 40 µl Zweitstrangsynthese-Mix (4 µl 10x second strand buffer; 1 µl DNA Polymerase I [5 U/µl]; 2 µl 20 mM dNTPs; 33 µl Millipore-Wasser) zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 16 °C inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden 140 µl Wasser zugegeben und der Ansatz mit 200 µl PCI, pH 8,0 versetzt und intensiv vermischt. Nach der anschließenden Zentrifugation (14 000 U/min, RT, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M NaAc, pH 5,2 versetzt und gemischt. Nach der Zugabe von 2 Volumenteilen 96 % (v/v) Ethanol und erneutem Mischen wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz zentrifugiert (14 000 U/min, 4 °C, 10 min, 16F24-11, Eppendorf) und das Pellet mit 50 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem erneuten Zentrifugieren (14 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf) wurde das Pellet an der Luft vollständig getrocknet und anschließend in 20 µl Wasser resuspendiert.

2.4.17.3 Restriktionsverdau und Adapterligation

Die Hälfte (= 10 µl) der resuspendierten cDNA wurde dem *TaqI*-Mix (4 µl 10x NEB Buffer3; 4 µl BSA [1µg/µl]; 1,25 µl *TaqI* [20 U/µl]; 20,75 µl Wasser) zugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 65 °C wurden 10 µl *ApoI*-Mix (1 µl 10x NEB Buffer3; 1 µl BSA [1 µg/µl]; 1,25 µl *ApoI* [4 U/µl]; 6,75 µl Wasser). Nach weiteren zwei Stunden bei 50 °C wurde der Adapter-Mix (1 µl 10x NEB Buffer3; 1,2 µl 10 mM ATP; 1 µl *ApoI*-Adapter [5 pmol/µl]; 1 µl *TaqI*-Adapter [50 pmol/µl]; 1,25 µl T4 DNA Ligase [4 U/µl]; 4,55 µl Wasser) hinzugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Adapterlösungen wurden wie folgt hergestellt: äquimolare Mengen von *ApoI*-Adapter fw und *ApoI*-Adapter rev, bzw. *TaqI*-Adapter fw und *TaqI*-Adapter rev wurden vermischt und für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

2.4.17.4 Präamplifikation

Für die Präamplifikation wurden 20 µl des Ligationsansatzes verwendet. Diese Menge wurde dem Präamplifikationsmix (5 µl 10x PCR Puffer; 0,7 µl 20 mM dNTPs; 1 µl *ApoI* Primer [100 ng/µl]; 1 µl *TaqI* Primer [100 ng/µl]; 0,5 µl *Taq/pfu*-Polymerase [160/1]; 21,8 µl Wasser) hinzugefügt und mittels PCR amplifiziert. Das verwendete Programm („Präamplifikation“) ist im Anhang aufgeführt.

2.4.17.5 Radioaktive Markierung der *ApoI*+2-Primer

Dem *ApoI*-Primer-Mix (1,3 µl 50µM *ApoI*+2 Primer; 3µl 10x Kinase Puffer; 0,7 µl T4 Polynukleotidkinase [5 U/µl]; 18,3 µl Wasser) wurden 6,7 µl [$\gamma^{33}\text{P}$]-ATP hinzugefügt und die Reaktion bei 37 °C für 30-60 Minuten inkubiert.

2.4.17.6 Selektive Amplifikation

Für die selektive Amplifikation wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Präamplifikation dem Amplifikationsmix (1 µl 9 µM *TaqI*+2 Primer; 0,5 µl radioaktiv markierte *ApoI*+2 Primer; 0,4 µl 20 mM dNTPs; 1 µl 10x PCR Puffer; 0,2 µl *Taq*-Polymerase [5 U/µl]; 5,9 µl Wasser) zugegeben. Für die PCR-Reaktion wurde das Programm „selektive Amplifikation“ (siehe Anhang) verwendet. Die PCR-Reaktion wurde über ein 7 M Harnstoff-Gel (32 g Harnstoff; 15 ml 5x TBE-Puffer; 15 ml Bis/Acrylamid (19:1); 350 µl 10 % (w/v) APS; 44 µl TEMED, ad 75 ml Wasser) bei 1800V und 60W aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier (3MM, Whatman, England) transferiert und bei 80 °C vakuumgetrocknet. Die Autoradiographie erfolgte durch Auflegen von BioMax MR Röntgenfilmen (Amersham Bioscience, Freiburg) für 3-14 Tage.

2.4.17.7 Klonierung von AFLP-Fragmenten

Die Fragmente von Interesse wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 30 µl TE-Puffer überschichtet. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde der Ansatz zentrifugiert (14 000 U/min, RT, 2 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). 1-5 µl des Überstandes wurden dem PCR-Mix (5 µl 10x PCR-Puffer; 0,5 µl 20 mM dNTPs; 1 µl 20 µM *ApoI*+2 Primer; 1 µl 20 µM *TaqI*+2 Primer; 0,25 µl *Taq*-Polymerase [5 U/µl]; 41,25 µl Wasser) für die folgende PCR eingesetzt. Zur Reamplifikation wurde das Programm „selektive Amplifikation“ (siehe Anhang) verwendet. Die erhaltenen PCR Produkte wurden über ein 1 %iges (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die Banden mit Hilfe des Qiagen Gel-Extraction Kits aus dem Gel eluiert. Die Extraktion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt und das Volumen für die Eluation der DNA beträgt 20 µl. 8 µl des Eluates wurden für die pGEM-T Ligation (vgl. 2.4.1) eingesetzt. Anschließend wurden kompetente *E. coli*-Zellen mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert (vgl. 2.4.1). Nach erfolgreicher Transformation wurden pro Ansatz vier Klone sequenziert.

2.4.18 Affymetrix-Microarray

2.4.18.1 RNA Isolation.

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde wie unter 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

2.4.18.2 cDNA-Synthese.

In einem Gesamtvolumen von 11 µl wurden 10 µg Gesamt-RNA und 1 µg T7-(dT)₂₄-Primer bei 70 °C inkubiert. Nach Ablauf von 10 Minuten wurde der Ansatz auf Eis gestellt, um ein schnelles Abkühlen zu erreichen. Anschließend wurden 7 µl Reaktionsmix (4 µl 5x first strand Buffer; 2 µl 0,1 M DTT; 1 µl 10 mM dNTPs) zugegeben und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 µl Superscript[®] II Enzym (200 U/µl) wurde der Reaktionsansatz für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach Abschluß der Erststrangsynthese wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und anschließend der Zweitstrangsynthese-Mix (91 µl RNase-freies H₂O; 30 µl 5x second strand buffer; 3 µl 10 mM dNTPs; 1 µl *E. coli*-DNA-Ligase [10 U/µl]; 4 µl *E. coli*-DNA-Polymerase I [10 U/µl]; 1 µl *E. coli*-RNase H [2 U/µl]) zugegeben. Daraufhin wurde der Ansatz vorsichtig mit einer Pipette gemischt und für 2 Stunden bei 16 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl T4-DNA-Polymerase (5 U/µl) wurde der Reaktionsmix für weitere 5 Minuten bei 16 °C inkubiert und die Zweitstrangsynthese anschließend durch die Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Zur Aufreinigung der synthetisierten cDNA wurde der komplette Reaktionsansatz mit 162 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 8.0) versetzt und kräftig vermischt. Das Gemisch wurde dann in ein Phase-Loc Gel Eppendorfgefäß (Eppendorf) überführt und zentrifugiert (10 800 U/min, 4 °C, 2 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und es wurden 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und nach gewissenhaftem Mischen zusätzlich 2,5 Vol. 96 % (v/v) Ethanol (-20 °C) zugegeben. Nach erneutem kräftigen Mischen wurde der Ansatz zentrifugiert (10 800 U/min, 4 °C, 30 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem (v/v) Ethanol (-20 °C) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 800 U/min, 4 °C, 30 min, Rotor 16F24-11, Eppendorf). Nach nochmaligem Waschen mit 70 %igem (v/v) Ethanol (-20 °C) wurde die gefällte cDNA an der Luft getrocknet und schließlich in 3 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.4.18.3 *In vitro* Transkription

1,5 μ l der resuspendierten cDNA wurden mit dem Reaktionsmix (2 μ l 75 mM ATP; 2 μ l 75 mM GTP; 1,5 μ l 75 mM CTP; 1,5 μ l 75 mM UTP; 2 μ l 10x Buffer Mix; 2 μ l 10x Enzym Mix; T7-MegaScript Kit, Ambion) und biotinylierten Nukleotiden (3,75 μ l 10 mM Bio-11-CTP; 3,75 μ l 10 mM Biotin 16-UTP; Roche; Enzo) versetzt und mit der Pipette vorsichtig vermischt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 6 Stunden inkubiert. Die Aufreinigung der *in vitro* Transkription wurde laut Herstellerprotokoll mit dem RNAsasy Kit (Qiagen) durchgeführt. Zur Elution der cRNA wurden 30 μ l RNase freies Wasser (50 °C) verwendet. Der Durchlauf wurde anschließend noch einmal auf die Säule aufgetragen um eine maximale Ausbeute zu erzielen. Die Menge und Reinheit der cRNA wurde anschließend photometrisch bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Im Falle einer zu geringen cRNA Konzentration wurde die cRNA wie unter 2.4.1 beschrieben gefällt und in einem geringeren Volumen RNase-freiem Wasser erneut resuspendiert.

2.4.18.4 Fragmentierung der cRNA

Durch die Zugabe von 4 μ l 5x Fragmentierungspuffer (200 mM Tris/Acetate, pH 8,1; 500 mM KOAc; 150 mM MgOAc) zu 16 μ g cRNA und der anschließenden Inkubation bei 95 °C für 35 Minuten wurde die cRNA fragmentiert. Bis zur folgenden Hybridisierung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung der Fragmentierung wurden 1 μ l des Ansatzes und 0,8 μ g der noch nicht fragmentierten cRNA mittels eines 1,0 %igen (w/v) Agarosegels analysiert.

2.4.18.5 Hybridisierung und Färben der Microarrays

Dem Hybridisierungs-Mix (5 μ l control B2; 15 μ l 20x Hybridization controls; 3 μ l Hering Sperm DNA; 3 μ l BSA; 150 μ l 2x Hybridization Buffer; 104 μ l DEPC-Wasser) wurde die gesamte fragmentierte cRNA (= 15,2 μ g) hinzugegeben. Nach dem gründlichen Mischen wurde der Ansatz zunächst bei 99 °C und anschließend bei 45 °C je 5 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben zentrifugiert (12 000 U/min, RT, 5 min, Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Vom Überstand wurden 200 μ l für die Hybridisierung verwendet. Nach Ablauf der Hybridisierung (16 h, 45 °C, 60 U/min) wurden die Microarrays gefärbt und gescannt. Die Färbung wurde bis auf zwei Modifikationen laut Herstellerangaben durchgeführt. Erstens wurde das Volumen der Färbelösung (400 μ l 2x MES Farbe-Puffer; 32 μ l BSA [50 mg/ml]; 8 μ l Streptavidin R-phycoerythrin Konjugat [1 mg/ml]; 360 μ l DEPC-Wasser) und der Antikörperlösung (400 μ l 2x MES Farbe Puffer; 32 μ l BSA [50 mg/ml]; 8 μ l

goated IgG [10mg/ml]; 4,8 µl biotinylierter Antikörper [0,5 mg/ml]; 302 µl DEPC-Wasser) von 600 µl auf 800 µl erhöht. Des Weiteren wurde für den dritten Färbeschritt nicht eine neue Färbelösung hergestellt, sondern die Lösung von Färbeschritt 1 wiederverwendet. Für die Färbung und Verstärkung des „Arabidopsis genome arrays“ (Affymetrix, Santa Clara, USA) wurden die beiden Waschprotokolle EukGE-WS1v4 und EukGE-WS2v4 verwendet.

2.4.18.6 Scannen und Standardisierung der Microarrays

Nach dem Färben der Microarrays wurden die Chips gescannt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Auswertesoftware Affymetrix Microarray Suite 5.0 normalisiert. Hierfür wurden alle Parameter laut Voreinstellung übernommen und der TGT-Wert wurde auf 500 gesetzt. Die erhaltenen Daten wurden als Excel-Tabelle exportiert.

2.4.18.7 Auswertung der Microarrays

Die Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Alle Signalwerte unter 25 wurden auf 25 gesetzt und es wurden nur Gene für die weitere Auswertung verwendet, die in den behandelten Proben (Schwermetallstreß) bzw. bei *Arabidopsis halleri* (konstitutiver Vergleich) als „present“ oder „marginal“ eingestuft wurden. Gene wurden als induziert gewertet, wenn sie in zwei von drei unabhängigen Experimenten mindestens 2fach induziert waren (Schwermetallstreß). Gene wurden beim hoch stringenten Filter als konstitutiv höher exprimiert eingestuft, wenn sie in allen Experimenten (*A. thaliana* und *A. halleri*) als „present“ gewertet wurden und der Mittelwert des Signals der ersten drei *A. halleri*-Proben mindestens 8fach höher war als der Mittelwert des Signals der ersten drei *A. thaliana*-Proben. Nach der Durchführung weiterer unabhängiger Experimente wurde auch ein – in seiner Stringenz etwas reduzierter- Filter angewendet. Gene wurden als konstitutiv höher exprimiert eingestuft, wenn sie in drei von fünf unabhängigen Experimenten von *A. halleri* als „present“ oder „marginal“ gewertet wurden und der Mittelwert des Signals der *A. halleri*-Proben mindestens 7fach höher war als der Mittelwert des Signals der *A. thaliana*-Proben.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 2-D Gelelektrophorese

2.5.1.1 Proteinisolation

Etwa 1,5 g Wurzelgewebe wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 3 Volumen Homogenisierungspuffer (100 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 5 % (v/v) Glycerin; 5 mM EDTA, 0,5 % (w/v) PVP; 3 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma); 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) vermischt. Um einen optimalen Aufschluß zu erreichen wurden die Proben drei Minuten mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5 000 U/min, 4 °C, 5 min, Rotor: 16 A4-44, Eppendorf) und der Überstand abgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren (14 000 U/min, 4 °C, 10 min, Rotor: 16 F24-11, Eppendorf) wurde der Überstand abgenommen und mit gleichen Volumen an Tris gepuffertem Phenol (pH 7,5-8,0) vermischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor: 16 A4-44, Eppendorf) wurde die untere Phase entnommen und dieser Rückextraktionspuffer (0,1 M Tris, pH 8,4; 20 mM KCl; 10 mM EDTA; 0,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz kräftig gemischt und zentrifugiert (5000 U/min, 4 °C, 15 min, Rotor 16 A4-44, Eppendorf). Danach wurde die untere Phase erneut entnommen und der Extraktionsschritt

nochmals wiederholt. Nach Beendigung der zweiten Rückextraktion wurde die untere Phase mit mindestens 5 Volumen 0,1 M Ammoniumacetat (in Methanol gelöst) versetzt und gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 2 Stunden gelagert, um eine quantitative Präzipitation der Proteine zu gewährleisten. Nach Beendigung der Inkubation wurde der Ansatz zentrifugiert (5 000 U/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, Rotor 16A4-44, Eppendorf) und das Pellet in 0,1 M Ammoniumacetat (in Methanol gelöst) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 000 U/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Rotor 16 A4-44, Eppendorf) wurde das Pellet noch zweimal in 80 % (v/v) Tris-gepufferten Aceton, pH 8,0 resuspendiert. Am Schluß wurde der Ansatz zentrifugiert (5000 U/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Rotor 16 A4-44, Eppendorf), das Pellet in 200 μl Probenpuffer (7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 50 mM DTT; 2 % (w/v) IPG; 4 % (w/v) CHAPS; 0,4 % SDS; 5 mM K_2CO_3) aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.5.1.2).

2.5.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 3 μl der Probe mit 3 μl 0,1 M HCl und 1 ml $\frac{1}{4}$ Bradfordreagenz (Bio-Rad, München) versetzt und gründlich vermischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurden verschiedene BSA Verdünnungen analog behandelt und mit den Proteinproben verglichen.

2.5.1.3 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Für die Isoelektrische Fokussierung wurde 18 cm-IEF Streifen (Immobiline DryStrip pH 4–7, Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) verwendet, auf die 150 μg Gesamtprotein aufgetragen wurden. Die Proteinproben wurden mit Rehydrationspuffer (8 M Harnstoff; 2 % (w/v) CHAPS; 0,3 % (w/v) DTT; 0,5 % (w/v) IPG; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) auf 450 μl aufgefüllt. Die Proben wurden in den Streifenhalter eingefüllt und mit dem IEF-Streifen (Gelseite nach unten) abgedeckt. Anschließend wurde der Streifen mit DryStrip Cover Fluid (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) überschichtet. Die Fokussierung erfolgte im IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden) nach dem in Tabelle 7 aufgeführten Programm.

Tabelle 7: Programm der isoelektrischen Fokussierung für 18 cm IEF-Streifen, pH 4-7

Schritt	Zeit	Spannung
1	12 h	50 V
2	1 h	200 V
3	1 h	500 V
4	1 h	1000 V
5	1 h	im Gradient auf 8000 V
6	4,5 h	8000 V

2.5.1.4 SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurden die Streifen in ein Wasserbad getaucht, in neue Streifenhalter gelegt (Gelseite nach oben) und mit Lösung A (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) DTT) überschichtet. Nach 15 min wurde die Lösung durch Lösung B (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 2,5 % (w/v) Jodoacetamid) ersetzt. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Streifen aus den Streifenhaltern entnommen und in die Tasche der SDS-Gele

transferiert, die bereits mit Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt war. Für ein SDS-Gel wurden 28 ml Tridest, 22 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 1 ml 10 % (w/v) SDS, 30 µl TEMED und 450 µl 10 % (w/v) APS verwendet. Zur Befestigung des IEF-Streifens in der Tasche des SDS-Gels wurde heiße 0,5 %ige (w/v) Agarose verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in den ersten 30 min bei 3 W pro Gel. Anschließend wurde die Leistung auf 10 W pro Gel erhöht. Kurz bevor die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, die Gele fixiert und gefärbt (siehe 2.5.1.5).

2.5.1.5 Silberfärbung

Alle Schritte dieses Protokolls wurden bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Vor der eigentlichen Silberfärbung wurden die Gele über Nacht in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) fixiert. Am nächsten Tag wurden die Gele zweimal mit 30 % (v/v) Ethanol und einmal mit Millipore-Wasser gewaschen. Jeder dieser Schritte dauerte 20 min. Anschließend wurden die Gele für exakt eine Minute in 0,2g/l Natriumthiosulfat inkubiert und im Anschluß dreimal kurz mit Wasser gewaschen. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation in Silbernitratlösung (2 g/l AgNO₃; 750 µl/l Formaldehyd). Nachdem das Gel wieder dreimal kurz mit Millipore-Wasser gewaschen wurde, folgte eine Inkubation in Entwicklerlösung (30 g/l Na₂CO₃; 4 mg/l Natriumthiosulfat; 500 µl/l Formaldehyd). Dieser Schritt wurde durch den Transfer der Gele in Stopplösung (5 % (v/v) Essigsäure) beendet. Danach wurden die Gele in Millipore-Wasser gewaschen und bis zur Trocknung in Konservierungslösung (20 % (v/v) Ethanol; 3 % (v/v) Glycerin) aufbewahrt.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Atomabsorptionsspektrometrie

2.6.1.1 Waschen der Proben

Alle Schritte wurden bei 4 °C, für jeweils 10 Minuten und unter leichtem Schütteln ausgeführt. Direkt nach dem Ernten wurden die Wurzelproben einmal mit Millipore-Wasser, dreimal mit 10 mM CaCl₂-Lösung und abschließend wieder mit Millipore-Wasser gewaschen.

2.6.1.2 Aufschluß und Analyse der Proben

Das Pflanzenmaterial wurde mittels einer Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT2, Steris, Hurth) vollständig getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt. Die Proben wurden mit 6 ml konzentrierter HNO₃ (Ultrapure, Merck) und 4 ml Wasser versetzt und mit der Mikrowelle aufgeschlossen (microPrep A, MLS, Leitkirch). Anschließend wurde die Konzentration der verschiedenen Metalle mit einem AAnalyst 800 (Perkin Elmer, Rödgau-Jügesheim) bestimmt. Hierfür wurde bei den Metallen Zink und Cadmium der Flammenmodus (Acetylen-Luft-Gemisch) verwendet, wohingegen für die Kupferbestimmungen der Graphitrohrmodus (Argon-Luft-Gemisch) verwendet wurde. Für die Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Metalle wurden folgende charakteristische Wellenlängen gewählt. Die Messungen für Zink erfolgten bei 213,9 nm, für Kupfer bei 324,8 nm und Cadmium wurde bei 228,8 nm vermessen. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde für jedes Metall vor der eigentlichen Messung eine Eichgerade erstellt.

3 Ergebnisse

Die hier präsentierte Arbeit umfaßt zwei thematische Schwerpunkte. Das erste Ziel war die Identifizierung und Charakterisierung von potentiellen Hyperakkumulationsfaktoren in *A. halleri*. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von schwermetallregulierten Genen. Hierbei sollten sowohl allgemeine Mechanismen der Metallantwort, als auch - für einzelne Metalle - spezifische Mechanismen identifiziert werden. In diesem Zusammenhang lag ein besonderes Augenmerk auf an der Metallhomöostase beteiligten Signaltransduktionsprozessen (z.B. Metallperzeption oder transkriptionelle Kontrolle von Effektorproteinen).

3.1 Identifizierung potentieller Hyperakkumulationsfaktoren in *A. halleri*

3.1.1 Konstitutiver Vergleich zwischen *A. thaliana* und *A. halleri*

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse beruhen auf der Hypothese, daß der Hyperakkumulationsphänotyp von *A. halleri* ein konstitutiv ausgeprägtes Merkmal ist (Bert *et al.*, 2002; Macnair *et al.*, 2002). Dies bedeutet, daß sowohl Populationen von schwermetallbelasteten Standorten, als auch von nicht belasteten Habitaten Zink und Cadmium im Sproß hyperakkumulieren. Daraus läßt sich ableiten, daß alle Mechanismen, die für die Hyperakkumulation verantwortlich sind nicht als Reaktion auf hohe Schwermetallbelastung aktiviert werden, sondern jederzeit aktiv sind – auch wenn die Pflanze keinen erhöhten Schwermetallkonzentrationen ausgesetzt ist. Aus diesem Grund wurden Pflanzen der beiden Spezies *A. thaliana* und *A. halleri* unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Schwermetallstreß, angezogen und die Wurzeln der Pflanzen mittels „Arabidopsis genome arrays“ (Affymetrix, Santa Clara, USA; im folgenden als Affymetrix-Microarrays bezeichnet) untersucht. Für diesen Vergleich wurden je drei unabhängige Experimente verwendet. Alle Datensätze wurden mit Genechip Suite 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) unter Verwendung der voreingestellten Parameter normalisiert. Bei dieser Normalisierung wurde der TGT-Wert auf 500 gesetzt. Im Zuge dieser Normalisierung wurden für jeden Array spezifische Normalisierungsfaktoren ermittelt, die in Tabelle 8 aufgeführt sind.

Tabelle 8: Zusammenstellung der bei der Normalisierung erhaltenen Normalisierungsfaktoren.

	<i>A. thaliana</i>	<i>A. halleri</i>
Replikat 1	7,23	29,48
Replikat 2	6,65	27,70
Replikat 3	15,36	34,40

Im nächsten Schritt der Analyse wurden diejenigen Sondensätze herausgefiltert, die in allen drei unabhängigen Experimenten als „present“ eingestuft wurden. Dieses Qualitätskriterium läßt einen Rückschluß auf die statistische Signifikanz der ermittelten Werte zu. Die Einstufung „present“ ($p < 0,04$) besagt, daß der gemessene Wert sehr verläßlich die relative Transkriptionshäufigkeit widerspiegelt. Bei der Einstufung „marginal“ liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit mit $p < 0,06$ etwas höher, ist aber noch als tolerierbar anzusehen. Sondensätze, die als „absent“ gewertet wurden, sollten nur in Ausnahmefällen in die Auswertung mit einbezogen werden, da die ermittelten Werte eine hohe Fehlerwahrscheinlichkeit ($p > 0,06$) haben.

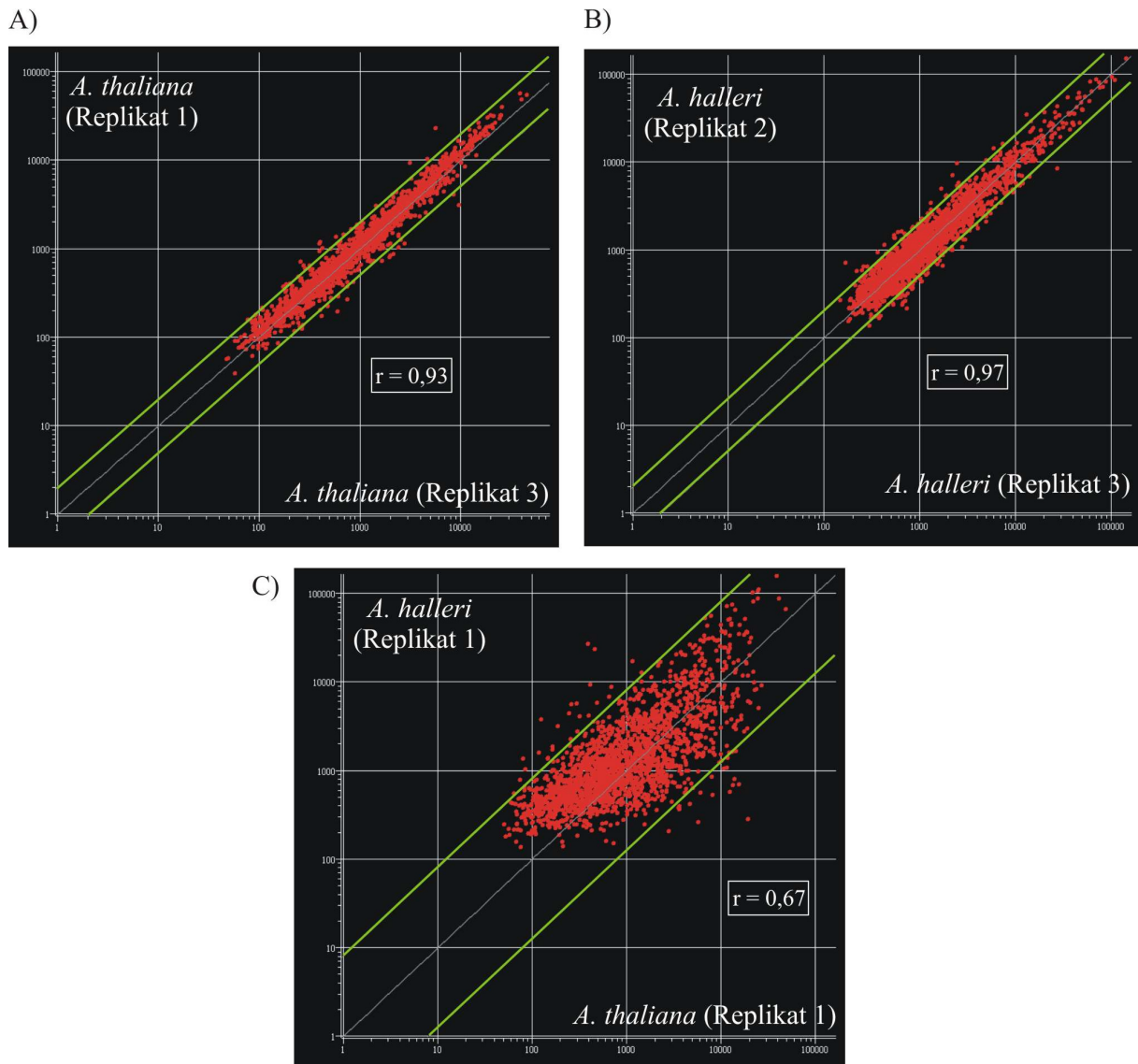


Abbildung 4: Scatter-Plot Auftragung von jeweils zwei unabhängigen Experimenten. (A) repräsentative Gegenüberstellung zweier *A. thaliana*-Experimente. Dargestellt sind alle 2019 Gene, die in beiden Arten verlässlich detektiert werden konnten. Die diagonalen grünen Linien geben eine zweifache Induktion bzw. Reprimierung an. (B) entsprechende Gegenüberstellung zweier *A. halleri*-Experimente (C) entsprechende Gegenüberstellung eines *A. thaliana*- und eines *A. halleri*-Experimentes. Datenpunkte, die jenseits der Diagonalen liegen, sind mindestens achtfach höher oder niedriger in *A. halleri*-Wurzeln exprimiert.. Für jeden Vergleich ist auch der Pearsonsche Korrelationskoeffizient (= r) angegeben.

Die Analyse der normalisierten Daten ergab, daß bei *A. thaliana* 4401 SONDENSÄTZE in allen drei Experimenten als „present“ eingestuft wurden. Die Auswertung der *A. halleri*-Proben ergab eine Anzahl von 2102 SONDENSÄTZEN. Für die weiterführenden Analysen wurden lediglich diejenigen SONDENSÄTZE verwendet, die sowohl in allen drei *A. thaliana*-, als auch in allen drei *A. halleri*-Experimenten als „present“ eingestuft wurden. Insgesamt erfüllten 2019 SONDENSÄTZE dieses Kriterium. Die Auswahl wurde so stringent getroffen, um die Anzahl der „falschpositiven“ Ergebnisse zu minimieren. Der Grund hierfür lag darin, daß zu Beginn der Experimente nicht abzusehen war, ob mit Hilfe von Affymetrix-Microarrays eine verlässliche Analyse von *A. halleri* möglich ist. Neben der stringenten Auswahl der SONDENSÄTZE wurde ebenfalls eine Scatter-Plot Analyse durchgeführt, bei der verschiedene Gegenüberstellungen (*A. thaliana* versus *A. thaliana*, *A. halleri* versus *A. halleri*, *A. thaliana* versus *A. halleri*)

getestet wurden. Zur Erstellung der Graphik (siehe Abbildung 4) wurde das Programm Genespring 6.0 verwendet (Silicon Genetics, Redwood City, USA).

Als „Positiv-Kontrolle“ wurde ein Scatter-Plot generiert, der zwei unabhängige *A. thaliana*-Experimente gegenüberstellt. Wie man in Abbildung 4 erkennen kann, erhält man bei der Gegenüberstellung von zwei unabhängigen *A. halleri*-Experimenten ein quasi identisches Bild, was auch durch einen ähnlichen Korrelationskoeffizienten zum Ausdruck kommt. Dies macht deutlich, daß alle Sondensätze, die in *A. halleri* reproduzierbar als „present“ eingestuft werden, sehr robuste Signalwerte liefern. Der einzige Unterschied zum „*A. thaliana* versus *A. thaliana*“-Vergleich besteht darin, daß die absolute Intensität der Signalwerte durchschnittlich etwas höher liegt, was sich in der Abbildung durch eine Verschiebung der Punktwolke hin zu höheren Intensitätswerten ausdrückt. Bei der Auftragung der beiden verwandten Spezies (Abbildung 4C) sieht man ebenfalls eine Konzentrierung der Punktwolke im Bereich der Winkelhalbierenden, weshalb man sagen kann, daß bei diesem Vergleich ein ähnliches Bild entsteht wie bei einer innerartlichen Gegenüberstellung. Die weitere Auswertung des „*A. thaliana* versus *A. halleri*“-Datensatzes ergab, daß 1077 Sondensätze einen weniger als zweifachen Expressionsunterschied und 1589 Sondensätze einen weniger als dreifachen Expressionsunterschied zeigten. Dies gab den ersten Hinweis darauf, daß die verwendeten Normalisierungs- und Auswertungsalgorithmen zu keiner Verfälschung der *A. halleri* Daten führten.

Im nächsten Schritt wurden die Transkriptniveaus der einzelnen Gene in *A. halleri* und *A. thaliana* verglichen und diejenigen Gene herausgefiltert, deren Expressionsstärke in *A. halleri* mindestens achtfach höher war. Zuvor wurden jedoch alle Signalwerte, die unter 25 lagen auf 25 gesetzt¹. Der Faktor 8 setzte sich aus der maximalen Differenz der Normalisierungsfaktoren, die auf die nächste ganze Zahl (= 4) aufgerundet wurde, und dem allgemein verwendeten Faktor für induzierte Transkripte (= 2) zusammen. Beide Werte wurden mit einander multipliziert. Auf diese Art konnten 25 Gene identifiziert werden, die in Tabelle 10 enthalten und dort grün unterlegt sind. Die nähere Betrachtung der 25 Kandidatengene ergab, daß mindestens vier Gene, laut Annotierung, im direkten Zusammenhang mit der Metallhomöostase in Pflanzen stehen. Diese Gene sind in Tabelle 9 aufgeführt. Auf eine Analyse von Genen, die in *A. halleri* signifikant niedriger exprimiert werden, wurde verzichtet, da ein niedrigeres Expressionssignal bei den *A. halleri*-Proben durch eine schlechtere Hybridisierungseffizienz – aufgrund des Sequenzunterschieds zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* – bedingt sein kann.

Tabelle 9: Auflistung der Kandidatengene, die in den Wurzeln von *A. halleri* ein mindestens achtfach höheres Expressionssignal zeigten und wahrscheinlich in Verbindung mit der Metallhomöostase stehen.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	x-fach höher in <i>A. halleri</i> -Wurzeln
20541_at	At5g56080	Nicotianamin-Synthase 2	73,4
14831_at	At4g33020	ZIP9	42,6
18045_at	At3g22460	O-Acetylserin-(thiol)-Lyase A2	13,3
18109_s_at	At2g23150	NRAMP3	8,4

Die Nicotianamin-Synthase 2 (At5g56080) zeigt von allen untersuchten Genen mit einem 73fach höheren Transkriptlevel den größten Unterschied. Aus der Literatur war bekannt, daß Nicotianamin bei der Eisenhomöostase von Pflanzen eine wichtige Rolle spielt und unter

¹ Dieser Schritt ist nötig, da Signalwerte unter 25 im Bereich des „Hintergrundrauschens“ liegen (Kreps *et al.*, 2002).

anderem auch weitere zweiwertige Metallionen komplexieren kann (von Wirén *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2003). Da es bereits verschiedene Hinweise in der Literatur gab, daß ZIP-Transporter verschiedene zweiwertige Metallionen transportieren können (Guerinot, 2000), sollte der Transporter ZIP9 (At4g33020) ebenfalls näher charakterisiert werden. Als weiterer Kandidat wurde die O-Acetylserin-(thiol)-Lyase A2 (At3g22460) ausgewählt, die ein elfach höheres Transkriptniveau in den Wurzeln von *A. halleri* zeigte. Der Schwefelstoffwechsel bzw. GSHpool ist ein wichtiger Faktor bei der Reaktion der Pflanze auf biotische und abiotische Stressoren. Da es sich bei der O-Acetylserin-(thiol)-Lyase um ein Schlüsselenzym der Cysteinbiosynthese handelt und eine Überexpression dieses Genes zu einer erhöhten Cadmiumtoleranz führen kann (Domínguez-Solís *et al.*, 2001), wurde dieses Gen in die Kandidatenliste aufgenommen. Das letzte Gen, das in unmittelbarer Beziehung zur Metallhomöostase steht, ist *NRAMP3*, welches in Wurzeln von *A. halleri* neunfach höher exprimiert wird. Wie von Thomine *et al.* (2000) gezeigt werden konnte, ist dieses Protein in der Lage, Fe^{2+} und Cd^{2+} zu transportieren und in der Vakuolenmembran lokalisiert (Thomine *et al.*, 2003).

3.1.2 Bestätigung der Microarrayergebnisse mittels RT-PCR

Nach der Bestimmung der Auswahlkriterien und der Identifikation von interessanten Kandidatengenen, war es nötig, die erhaltenen Daten unabhängig zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurde die Expression der vier Gene Nicotianamin-Synthase 2 (*NAS2*), *ZIP9*, O-Acetylserin-(thiol)-Lyase A2 (*OAS-A2*) und *NRAMP3* mittels RT-PCR untersucht. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, war es möglich, für alle untersuchten Gene die höhere Expression in den Wurzeln von *A. halleri* zu bestätigen. Somit konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Normalisierungs- und Auswertelgorithmen für einen speziesübergreifenden Vergleich verwendet werden können.

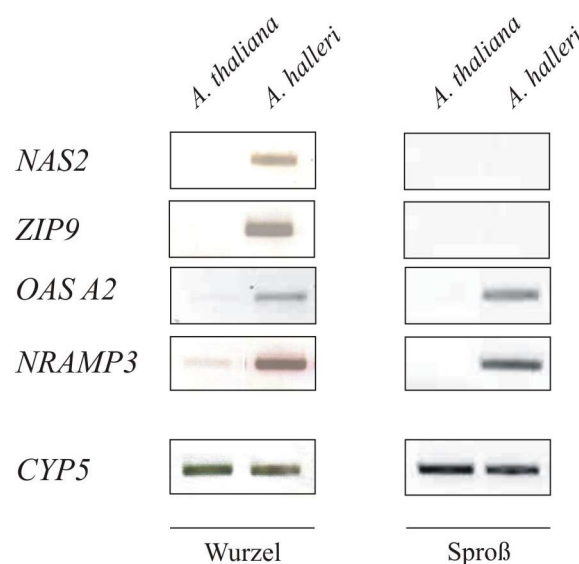


Abbildung 5: RT-PCR-Analyse zur Bestätigung der Microarrayergebnisse. Die Transkriptakkumulation der Gene *NAS2* (At5g56080), *ZIP9* (At4g33020), *OAS-A2* (At3g22460) und *NRAMP3* (At2g23150) wurde in den unterschiedlichen Geweben und Spezies untersucht. Das Gen *CYP5* (At2g29960) diente als konstitutive Kontrolle. Auf der linken Seite sind die Transkriptlevel in den Wurzeln der beiden Spezies *A. thaliana* und *A. halleri* unter Kontrollbedingungen dargestellt. Auf der rechten Seite ist das sproßspezifische Expressionsprofil der Gene zu sehen.

Vergleicht man die Expression der einzelnen Gene in der Wurzel mit den Ergebnissen aus dem Sproßgewebe, so fällt auf, daß die beiden Gene *NAS2* und *ZIP9* nur in den Wurzeln von *A. halleri* exprimiert werden. Für die Gene *OAS-TL* und *NRAMP3* konnte im Sproß eine Expression detektiert werden, die der Situation in der Wurzel entsprach.

Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation wurden alle Fragmente aus *A. thaliana* und *A. halleri* kloniert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab, daß für alle vier getesteten Gene ein homologes Gen in *A. halleri* zu identifizieren war. Zusammenfassend kann man sagen, daß durch diese Experimente erstmals gezeigt werden konnte, daß Affymetrix-Microarrays ein nützliches Werkzeug für die Identifikation potentiell interessanter Gene aus *A. halleri* sein können.

3.1.3 Weniger stringente Auswertung der Affymetrixdaten

Nachdem durch die unabhängige Bestätigung sichergestellt werden konnte, daß die verwendeten Auswertungsalgorithmen zu verlässlichen Daten führen, sollte eine erneute Filterung unter weniger stringenten Bedingungen durchgeführt werden. Im Gegensatz zur ersten Analyse standen zu diesem Zeitpunkt insgesamt vier (*A. thaliana*) bzw. fünf (*A. halleri*) unabhängige Experimente pro Spezies für eine Auswertung zur Verfügung. Für die anschließende Filterung der Daten wurden folgende Parameter definiert:

- i) ein Sondensatz muß in drei von fünf *A. halleri*-Experimenten als „present“ oder „marginal“ eingestuft sein
- ii) alle Signalwerte, die unter 25 liegen werden auf 25 gesetzt²
- iii) für jeden Sondensatz wird der Mittelwert (n = 4 bzw. 5) der Signalstärke ermittelt
- iv) die Signalstärke in *A. halleri* muß mindestens um den Faktor 7 höher sein

Tabelle 10: Auflistung der Sondensätze, die in den Wurzeln von *A. halleri* ein mindestens siebenfach höheres Expressionssignal zeigten. Gene, die bereits im Zuge der hochstringenten Auswertung herausgefiltert wurden, sind grün unterlegt. Gene, die wahrscheinlich eine Rolle in der Metallhomöostase spielen, sind rot umrandet.

Affy-ID	AGI	Genprodukt	x-fach höher in <i>A. halleri</i>
20541_at	At5g56080	Nicotianamin-Synthase 2	58,6
15961_at	At4g11310	Cystein-Proteinase	52,3
15374_at	At5g44440	ähnlich zu Berberinbrücken formendem Enzym	41,8
14831_at	At4g33020	ZIP9	34,3
19521_s_at	At2g27880	ähnlich zu Argonautprotein	30,4
15659_s_at	At1g61520	ähnlich zu Chlorophyll a/b-bindendem Protein	29,8
19689_at	At5g24140	Squalen-Monooxygenase 2	27,3
18584_at	At1g10970	ZIP4	25,1
19934_at	At5g39430	hypothetisches Protein	22,2
18213_at	At4g22070	WRKY-Transkriptionsfaktor	19,8
16418_s_at	At1g79040	ähnlich zu Photosystem II-Polypeptid	19,2
15437_at	At4g33550	Protease-Inhibitor	19,0
18415_s_at	At1g27560	F-Box Protein	18,2
12757_at	At1g02300	putative Cathepsin B-ähnliche Cystein Protease	17,1
18716_at	At1g75830	putatives pflanzliches Defensinprotein (PDF1.1)	16,5
14083_at	At2g41380	ähnlich zu "embryo-abundant"-Protein	16,4
18028_at	At5g43270	ähnlich zu Squamosapromotor bindendem Protein	16,3
18451_s_at	At4g33710	PR1 ähnliches Protein	15,8

² Diese Schritt ist nötig, da Signalwerte unter 25 im Bereich des „Hintergrundrauschens“ liegen (Kreps *et al.*, 2002)

Affy-ID	AGI	Genprodukt	x-fach höher in <i>A. halleri</i>
14478_at	At4g33110	exprimiertes Protein	15,2
20220_at	At4g02280	Putative Saccharose-Synthase	15,1
19294_at	At4g28850	putative Xyloglucan-Endotransglycosylase	14,6
14609_at	At2g30770	Cytochrome P450	14,3
15703_i_at	At2g43520	Trypsininhibitor-verwandtes Protein	14,2
20190_at	At2g16660	Nodulinähnliches Protein	14,0
12269_s_at	At4g34650	Squalensynthase 2 (SQS2)	13,8
12714_f_at	At5g65230	MYB-Transkriptionsfaktor	13,5
15101_s_at	At3g14940	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PPC)	12,5
15190_s_at	At2g26740	Epoxid-Hydrolase	12,3
15209_s_at	At4g17600	Lil3-Protein	11,9
20655_at	At2g25150	Transferase	11,8
20648_s_at	At2g34460	ähnlich zu Flavinreduktase	11,6
15062_at	At1g49320	exprimiertes Protein	11,4
12817_g_at	At1g78830	Mannose-bindendes Protein	10,8
14260_at	At2g27440	ähnlich zu RAC-GTPase-aktivierendem Protein	10,8
15000_at	At2g16580	putatives Auxin-induziertes Protein	10,8
15299_s_at	At1g30660	hypothetisches Protein	10,7
15453_s_at	At4g14020	exprimiertes Protein	10,7
17573_at	At1g70940	putativer Auxin-Transporter	10,7
18045_at	At3g22460	O-Acetylserine-(thiol)-Lyase A2	10,7
14542_i_at	At2g24280	Prolylcarboxypeptidase-ähnliches Protein	10,6
15931_at	At1g21670	exprimiertes Protein	10,1
19296_at	At4g30120	HMA3	10,0
17730_s_at	At5g61850	“LFY floral meristem identity control”-Protein	9,7
17871_at	At2g16360	40S ribosomales Protein S25	9,7
18254_at	At2g46080	exprimiertes Protein	9,4
13486_at	At1g30560	putativer Transporter	9,3
19592_at	At3g49960	putative Peroxidase	9,2
12935_s_at	At3g16650	PP1/PP2A-Phosphatase	9,1
14653_s_at	At4g34650	Squalensynthase 2 (SQS2)	9,1
16825_at	At2g27120	ähnlich zu katalytischer Untereinheit einer DNA-Polymerase	9,1
16910_s_at	At2g25940	ähnlich zu vakuolärem Enzym	9,0
12701_i_at	At2g19060	GDSL-Motiv Lipase/Hydrolase	8,9
17494_s_at	At3g29030	putatives Expansin (EXP5)	8,9
16881_at	At1g69990	putative LRR-Proteinkinase	8,8
17019_s_at	At2g46830	MYB-ähnlicher Transkriptionsfaktor (CCA1)	8,8
17332_s_at	At4g22080	Polysaccharid-Lyase	8,6
18109_s_at	At2g23150	NRAMP3	8,5
15581_s_at	At2g28190	Kupfer/Zink Superoxiddismutase	8,4
17166_at	At1g16310	Kationen-Effluxprotein	8,4
20135_at	At1g14220	Ribonuklease	8,4
12267_at	At1g09420	ähnlich zu Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	8,3
12795_at	At1g13090	Cytochrom P450	8,3
19037_at	At2g25700	E3 Ubiquitinligase-SCF Komplex Untereinheit	8,1
20117_at	At4g16370	isp-4-ähnliches Protein	8,1
15115_f_at	At2g05380	glycinreiches Protein	7,9
16039_s_at	At2g02100	putatives Pflanzen-Defensin-Protein	7,7
15154_s_at	At3g47340	Glutamin-abhängige Asparaginsynthetase	7,6
16070_s_at	At3g60280	Uclacyanin 3	7,6
20289_at	At4g36450	putative MAP-Kinase (MPK14)	7,5
16465_at	At5g02490	Hitzeschockprotein (hsc70.2)	7,4
17493_s_at	At4g23980	Auxin-responsiver Transkriptionsfaktor (ARF9)	7,2
20348_at	At2g24210	Myrcen/Ocimen-Synthase	7,2

Tabelle 10 fortgesetzt

Der Faktor 7 setzt sich aus der Differenz der Normalisierungsfaktoren (= 3,3) und dem allgemein verwendeten Faktor für induzierte Transkripte (= 2) zusammen. Beide Werte wurden miteinander multipliziert und das Ergebnis wurde auf ganze Zahlen aufgerundet. Die durchgeführte Analyse ergab, daß insgesamt 2804 SONDENSÄTZE das „present/marginal“-Kriterium erfüllten, von denen wiederum 72 (siehe Tabelle 10) eine mindestens siebenfach höhere Signalstärke in den *A. halleri*-Proben zeigten. Die SONDENSÄTZE, die bereits bei der hoch stringenten Auswertung selektiert wurden, sind grün unterlegt.

Die Abweichungen der Expressionsdifferenzen (vgl. Tabelle 9) sind dadurch zu erklären, daß bei dieser Analyse zwei zusätzliche *A. halleri*-Proben und eine zusätzliche *A. thaliana*-Probe in die Berechnung miteinbezogen wurden. Die Expressionsdifferenzen betragen bei fast allen Genen weniger als 25 %. Die einzigen Ausnahmen stellen die Gene At1g30560, At3g49960 und At4g33710 mit einer Differenz von 26 %, 28 % bzw. 86 % dar. Zusammenfassend kann man sagen, daß durch die weniger stringente Auswertung 47 zusätzliche SONDENSÄTZE identifiziert werden konnten, von denen die beiden Gene *ZIP4* und *HMA3* (siehe Tabelle 11) Transporter repräsentieren, die in einem direkten Zusammenhang mit der Metallhomöostase stehen (Grotz *et al.*, 1998; Gravot *et al.*, 2004).

Tabelle 11: Auflistung der zwei Kandidatengene, die bei der weniger stringenten Auswertung des konstitutiven Vergleichs ermittelt wurden und darüber hinaus einen direkten Bezug zur Metallhomöostase haben könnten.

Affy-ID	AGI	Genprodukt	x-fach höher in <i>A. halleri</i> -Wurzeln
18584_at	At1g10970	ZIP4	25,1
19296_at	At4g30120	HMA3	10,1

Als unabhängige Bestätigung der erhaltenen Daten sollte das Expressionsmuster des Gens *ZIP4* mittels RT-PCR bestimmt werden. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 6 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß sowohl in den Wurzeln, als auch im Sproß der *A. halleri*-Proben, ein höheres *ZIP4*-Transkriptlevel detektiert werden konnte. Allerdings ist der Unterschied im Sproß weniger stark ausgeprägt als in den Wurzeln. Die anschließende Klonierung und Sequenzierung der PCR-Fragmente ergab, daß in den *A. halleri*-Proben das homologe Gen zu *AtZIP4* amplifiziert wurde.

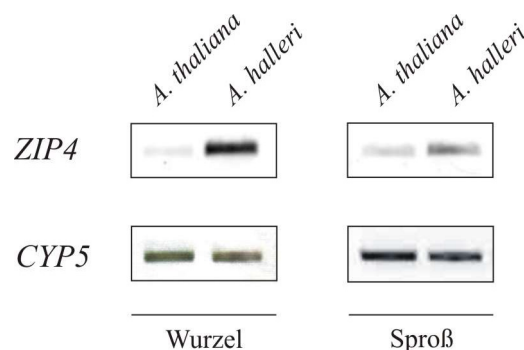


Abbildung 6: RT-PCR Analyse zur Bestätigung der Microarrayergebnisse. Die Transkriptakkumulation des Gens *ZIP4* (At1g10970) wurde in den unterschiedlichen Geweben und Spezies untersucht. Das Gen *CYP5* (At2g29960) diente als konstitutive Kontrolle. Auf der linken Seite ist das Transkriptniveau in den Wurzeln, auf der rechten Seite das Transkriptniveau im Sproß der beiden Spezies *A. thaliana* und *A. halleri* unter Kontrollbedingungen dargestellt.

3.1.4 Nähere Charakterisierung einzelner Kandidatengene

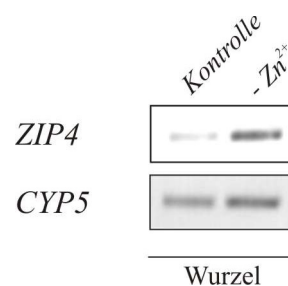
Im Anschluß an die erfolgreiche unabhängige Bestätigung der Microarray-Daten sollten im nächsten Schritt einige ausgewählte Gene näher charakterisiert werden. Bei der Betrachtung der Liste von konstitutiv höher exprimierten Gene (siehe Tabelle 10) fällt auf, daß die beiden Gene mit der größten (*NAS2*) bzw. viertgrößten (*ZIP9*) Expressionsdifferenz eine direkte Verbindung zur Metallhomöostase vermuten lassen³. Da es sich bei *ZIP9* um einen putativen Zinktransporter handelt (Guerinot, 2000) und für Nicotianamin neben Fe^{2+} auch eine Zn^{2+} -Komplexierung beschrieben wurde (Benes *et al.*, 1983; Takahashi *et al.*, 2003), war es denkbar, daß diese Gene an der Hyperakkumulation von Zink in *A. halleri* beteiligt sind. Um diese Theorie zu stützen, sollte die Expression dieser beiden Gene unter verschiedenen Zinkangeboten der Pflanze untersucht werden. Der Grund hierfür liegt in den Beobachtungen bei einem anderen Zinkhyperakkumulierer – *Thlaspi caerulescens*. Bei dieser Pflanze wurde gezeigt, daß der Grund für die Hyperakkumulation wahrscheinlich in einer fehlenden Reprimierung von Zinkdefizienzmechanismen zu sehen ist (Lasat *et al.*, 2000). Dies bedeutet, daß Gene, die normalerweise ausschließlich unter Zinkdefizienz exprimiert werden, auch unter normalen Bedingungen aktiv sind.

3.1.4.1 Zinkabhängige Expression von *NAS2* und *ZIP9*

Für die Untersuchungen zur Transkriptakkumulation wurden hydroponisch kultivierte Pflanzen beider Arten für eine Woche bei unterschiedlicher Zinkversorgung kultiviert. Um Zinkmangelbedingungen zu erzeugen, wurde normales Hoaglandmedium ohne Zn^{2+} eingesetzt. Um sicherzustellen, daß unter diesen Bedingungen wirklich eine Zinkdefizienz entsteht, wurde die Transkriptakkumulation des Genes *AtZIP4* untersucht, welches unter Zinkdefizienz verstärkt exprimiert wird (Grotz *et al.*, 1998). Wie man in Abbildung 7 erkennen kann, war das Transkriptlevel in den Wurzeln der zinkdefizienten *A. thaliana* Pflanzen deutlich erhöht.

Abbildung 7:

RT-PCR Analyse der *ZIP4*-Expression unter normalen (links) und Zinkdefizienzbedingungen (rechts) in den Wurzeln von *A. thaliana*.



Für die Erzeugung von Zinkstreß wurden dem normalen Hoaglandmedium zusätzlich 30 μM Zn^{2+} beigemischt. Nach einer Woche wurden die Pflanzen geerntet, Gesamt-RNA isoliert und eine cDNA-Synthese durchgeführt. Die Ergebnisse der anschließenden RT-PCR sind in Abbildung 8 zusammengefaßt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß unter den getesteten Bedingungen sowohl für *NAS2*, als auch für *ZIP9* keine Expression im Sproß beider Arten zu detektieren ist. Übereinstimmend ist auch die Beobachtung, daß bei Zinkübersversorgung die Expression beider Gene reduziert wird. Dies führt in *A. thaliana* zu einer kompletten Abschaltung der Gene. Darüber hinaus kann der generelle Trend beobachtet werden, daß das Expressionsprofil in beiden Arten

³ Da die Identifizierung von *AtZIP4* erst bei der, zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführten, weniger stringenten Auswertung erfolgte, wurde dieses Gen in Bezug auf die Hyperakkumulation bei diesen Versuchen nicht berücksichtigt.

prinzipiell gleich ist, jedoch in *A. halleri* ein höheres Grundniveau zu finden ist. Bei einer drastischen Erhöhung der Zyklenzahl war es manchmal möglich, ein schwaches Signal für *NAS2* bei +Zn im Sproß beider Arten zu erhalten. Da dieses Resultat jedoch nicht zweifelsfrei reproduzierbar war, wurde es nicht in die Abbildung aufgenommen.

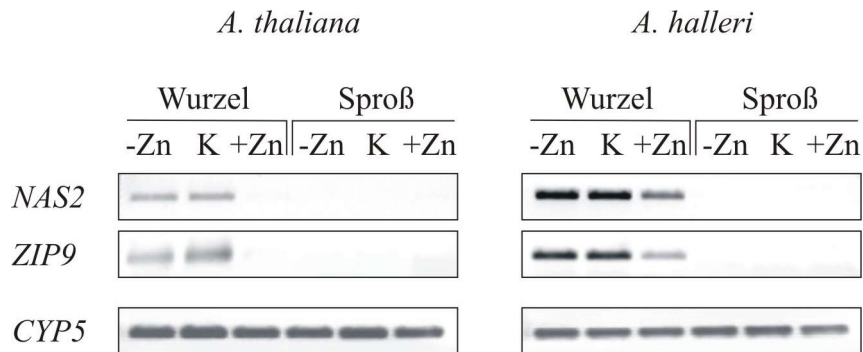


Abbildung 8: RT-PCR-Analyse der *NAS2*- und *ZIP9*-Transkriptlevel bei unterschiedlicher Zinkversorgung. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse für *A. thaliana*, auf der rechten Seite die Ergebnisse für *A. halleri* dargestellt. Bei allen drei unabhängigen Wiederholungen des Experimentes war eine qualitative Übereinstimmung der Ergebnisse zu beobachten.

3.1.4.2 ZIP9 (ZRT IRT-like Protein 9)

Wie bereits erwähnt, ist eine Deregulierung der Defizienzmechanismen eine mögliche Erklärung für den Hyperakkumulationsphänotyp in Pflanzen. Da die beiden Gene *NAS2* und *ZIP9* ein Expressionsprofil zeigten, das in dieses Schema einzuordnen ist (siehe 3.1.4.1), sollten sie näher charakterisiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeiten war bekannt, daß Transporter der ZIP-Familie die Fähigkeit besitzen, zweiwertige Metallionen wie z.B. Cd^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} zu transportieren (Guerinot, 2000). Darüber hinaus ergab ein Vergleich mit Internetdatenbanken (www.mips.gsf.de), daß es sich bei *ZIP9* um einen Zn^{2+} - bzw. Cd^{2+} -Transporter handeln könnte. Um die Vorhersage zu überprüfen, sollte *ZIP9* aus *A. thaliana* und *A. halleri* heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Da zu Beginn der Arbeiten noch keine vollständige Sequenz des *ZIP9*-Gens aus *A. halleri* verfügbar war, wurde eine RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt. Aufgrund des Datenbankeintrags für *AtZIP9* wurde ein Transkript, das für ein 344 Aminosäuren langes Protein kodiert, erwartet. Die Sequenzierung der RACE-Fragmente ergab jedoch, daß neben diesem erwarteten Fragment auch eine längere Version des Gens, die 47 Aminosäuren mehr umfaßt, in den Wurzeln von *A. halleri* exprimiert wird (siehe Abbildung 9).

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die längere Version des Gens eine *A. halleri* spezifische Besonderheit ist, oder ob auch in *A. thaliana* eine längere Version dieses Gens exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde die *A. halleri*-Sequenz mit der genomischen Sequenz von *A. thaliana* verglichen. Mit Hilfe dieser Analyse war es möglich auch für *A. thaliana* eine längere Version zu postulieren (siehe Abbildung 9). Um diese Vermutung zu überprüfen wurden Primer (siehe Anhang) für die lange und kurze Version der Gene abgeleitet und eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Um eine Matrize für diese Analyse zu erhalten, wurde RNA aus den Wurzeln beider Arten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Wie man in Abbildung 10 sehen kann, war es in beiden Arten möglich, die lange Version des

Gens zu amplifizieren, wodurch gezeigt werden konnte, daß auch in den Wurzeln von *A. thaliana* eine für 391 Aminosäuren kodierende mRNA von *AtZIP9* exprimiert wird. Dieses Ergebnis belegt, daß die in den Datenbanken (www.mips.gsf.de; www.ncbi.nlm.nih.gov) verzeichnete Sequenz für *AtZIP9* nicht korrekt ist.

1	M S L L Q D F W Q F L R P L S S G L T E S F T T S C D S G D	AtZIP9
1	M S L L Q D F W Q F L R P L S S G L T E S F T T S C D S G E	AhZIP9
31	S D P C R D D A A A L T L K F A A M A S I L I S G A A G V S	AtZIP9
31	S D P C R D D A A A L T L K F A A M A S I L I S G A A G V S	AhZIP9
61	I P L V G T L L P L N G G L M R G A K A F A A G V I L A T G	AtZIP9
61	I P L V G S L L P S S G G L M R G A K A F A A G V I L A T G	AhZIP9
91	F V H M L S G G S K A L S D P C L P E F P W K M F P F P E F	AtZIP9
91	F V H M F S G G S K A L S N P C L P E F P W K M F P F P E F	AhZIP9
121	F A M V A A L L T L L A D F M I T G Y Y E R K Q E K M M N Q	AtZIP9
121	F A M V A A L L T L L A D F M I T G Y Y E R K Q E K M - N Q	AhZIP9
151	S V E S L G T Q V S V M S D P G L E S G F L R D Q E D G G A	AtZIP9
150	S V E S L G T H V S V M S N P S L E S G F L R D Q E D G G A	AhZIP9
181	L H I V G M R A H A E H H R H S L S M G A E G F E A L S K R	AtZIP9
180	L H I V G M R A H A D H H R H S L S M G A E V F E A L S K R	AhZIP9
211	S G V S G H G H G H S H G H G D V G L D S G V R H V V V S Q	AtZIP9
210	A G V S G H G H G H - - - - G D V G L D S G V R H V V V S Q	AhZIP9
241	I L E M G I V S H S I I I G I S L G V S H S P C T I R P L L	AtZIP9
236	I L E M G I V S H S I I I G I S L G V S H S P C T I R P L L	AhZIP9
271	L A L S F H Q F F E G F A L G G C V A E A R L T P R G S A M	AtZIP9
266	L A L S F H Q F F E G F A L G G C V A E A R L T P R G S A M	AhZIP9
301	M A F F F A I T T P I G V A V G T A I A S S Y N S Y S V A A	AtZIP9
296	M A F F F A I T T P I G V A V G T A I A S S Y N S Y S V A S	AhZIP9
331	L V A E G V L D S L S A G I L V Y M A L V D L I A A D F L S	AtZIP9
326	L V A E G V L D S L S A G I L V Y M A L V D L I A A D F L S	AhZIP9
361	K K M S V D F R V Q V V S Y C F L F L G A G M M S A L A I W	AtZIP9
356	K E M S V D F R L Q V V S Y C F L F L G A G M M S A L A I W	AhZIP9
391	A .	AtZIP9
386	T .	AhZIP9

Abbildung 9: Proteinsequenz der *ZIP9*-Gene aus *A. thaliana* und *A. halleri*. Der neu identifizierte kodierende Bereich ist grün unterlegt. Putative Transmembrandomänen sind mit einem blauen Rechteck gekennzeichnet. Die putative Metallbindungsstelle ist rot umrandet.

Nach der Bestimmung der korrekten *A. thaliana*- und *A. halleri*-Sequenz wurden die verschiedenen Versionen der Gene in Hefe exprimiert. In den anschließenden Wachstumsassay sollte gezeigt werden, ob es möglich ist, mit der Expression des ZIP9-Transporters den Phänotyp der *zhy3* *S. cerevisiae*-Mutante (Zhao *et al.*, 1996b) zu komplementieren. In dieser Mutante wurden die beiden wichtigsten Gene (*ZRT1* und *ZRT2*)

für die Zinkaufnahme inaktiviert, was darin resultiert, daß die Mutante unter Zinkmangelbedingungen nicht mehr wachsen kann.

Die Bedingungen für den Wachstumsassay wurden so gewählt, daß sich zum einen die Wachstumsrate der *zhy3*-Mutante sehr stark von der des Wildtyp-Stammes unterschied und zum anderen schon eine geringe Erhöhung (= 5 µM) der externen Zn^{2+} -Konzentration ein deutlich verbessertes Wachstum (ca. 90 % höhere OD_{600}) der *zhy3*-Mutante bewirkte. Die heterologe Expression der beiden Versionen des *ZIP9*-Gens aus *A. thaliana* und *A. halleri* führte unter den getesteten Bedingungen jedoch zu keiner Komplementation des *zhy3*-Mutantenphänotyps. Bei diesen Versuchen konnte auch kein Unterschied zwischen der langen und kurzen Version des Proteins festgestellt werden. Aufgrund dieser Resultate konnte die Frage nicht beantwortet werden, ob die unterschiedliche Proteingröße einen Einfluß auf die Aktivität des Proteins hat.

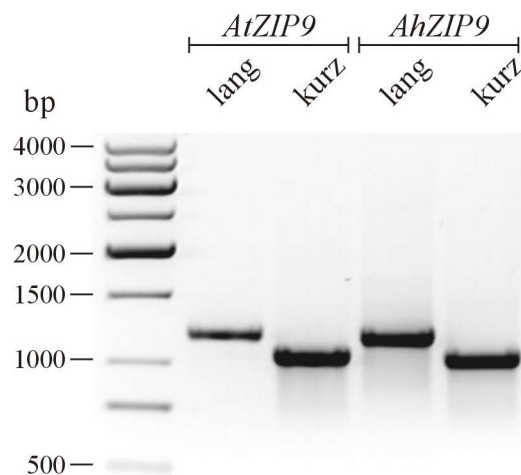


Abbildung 10: RT-PCR zur Amplifikation der verschiedenen *ZIP9*-Versionen aus *A. thaliana* und *A. halleri*.

3.1.5 Nicotianamin-Synthase

Ein weiterer Kandidat für eine nähere Charakterisierung war die Nicotianamin-Synthase 2, die im Vergleich zu *A. thaliana*- in *A. halleri*-Wurzeln ca. 70fach höher exprimiert wird. Nachdem die Ergebnisse der Microarrayanalyse mittels RT-PCR bestätigt werden konnten, sollte im folgenden geklärt werden, ob das Gesamttranskriptlevel aller vier *NAS*-Gene, die im Genom von *A. thaliana* identifiziert wurden, in beiden Arten unterschiedlich ist. Dieser Sachverhalt ist nicht automatisch gegeben, da es möglich ist, daß in den beiden Arten das Transkriptlevel der verschiedenen Isoformen unterschiedlich verteilt ist. Im Falle der *OAS-TL* (siehe 3.1.8) z.B. ergab eine Analyse der Proteinmenge, daß diese in beiden Arten gleich ist, obwohl eine Isoform der *OAS-TL* elffach höher in *A. halleri* exprimiert wird.

Um nun das Gesamttranskriptlevel zu bestimmen, wurde ein *Northern*-Blot mit einer *AtNAS2* spezifischen Sonde unter niedrig stringenten Bedingungen angefertigt. Der Grund für die niedrige Stringenz lag darin, daß möglichst viele *NAS*-Gene mit der von *AtNAS2* abgeleiteten Sonde detektiert werden sollten. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Abbildung 11 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß das *NAS*-Gesamttranskriptlevel in der Wurzel von *A. halleri* stark erhöht ist.

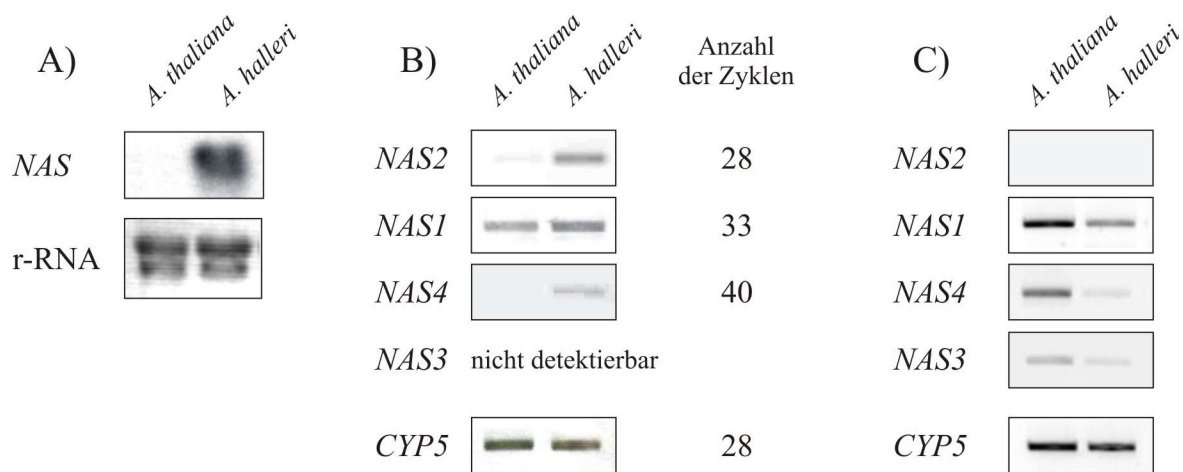


Abbildung 11: Expressionsanalyse der NAS-Genfamilie in den Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri*. (a) Northern-Blot-Analyse von RNA, die aus den Wurzeln von hydroponisch kultivierten Pflanzen isoliert wurde. (b) RT-PCR Analyse der vier NAS-Gene in den Wurzeln. (c) RT-PCR-Analyse der vier NAS Gene im Sproß. Die verwendeten Primer wurden basierend auf der Sequenz der *A. thaliana*-Isoformen abgeleitet (siehe Anhang).

Durch RT-PCR Experimente mit Hilfe isoformspezifischer Primer sollte im folgenden geklärt werden, ob nur eine oder mehrere der Isoformen für diesen Unterschied verantwortlich sind. Zu Beginn dieser Untersuchung wurden alle Primer unter Verwendung von genomischer DNA aus *A. halleri* getestet. Nachdem sichergestellt werden konnte, daß alle Primer auch bei *A. halleri*-Proben funktionieren, wurden die PCR-Fragmente kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, daß zum einen alle Primer spezifisch nur das Transkript einer einzigen Isoform amplifizierten und zum anderen für jede Isoform ein homologes Gen in *A. halleri* gefunden werden konnte. Die Analyse der einzelnen Isoformen zeigte, daß hauptsächlich die Isoform *NAS2* für den Unterschied zwischen den beiden Spezies verantwortlich ist. Das Gen *NAS3* zeigt zwar ebenfalls eine höhere Expression in Wurzeln von *A. halleri*, das absolute Transkriptlevel jedoch ist sehr gering, da 40 Zyklen bei der PCR nötig waren, um ein Signal zu detektieren. Die Isoform *NAS1* zeigte in beiden Spezies eine identische Expression und kann somit für den Unterschied im NAS-Transkriptlevel nicht verantwortlich sein.

Die Situation im Sproß der beiden Arten ist etwas unterschiedlich im Vergleich zu den Wurzeln. Für die Isoform *NAS2* konnte in keiner der beiden Arten eine Expression im Sproß nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, daß die Isoform *NAS2* nur in *A. halleri* zu detektieren ist und dort wahrscheinlich wurzelspezifisch exprimiert wird. Ein weiterer Unterschied ist die Expression der Isoform *NAS3*, die in den Wurzeln beider Arten nicht detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte im Sproß beider Arten eine Expression nachgewiesen werden. Das Transkriptlevel ist in *A. thaliana* leicht erhöht im Vergleich zu *A. halleri*. Ein höheres Transkriptlevel im Sproß von *A. thaliana* konnte auch für die beiden restlichen Isoformen *NAS1* und *NAS4* detektiert werden. Um auszuschließen, daß das niedrigere Expressionsignal in den *A. halleri*-Proben auf eine schlechtere Bindung der Primer zurückzuführen ist, wurden die PCR-Reaktionen mit Primern wiederholt, die in Bereichen binden, die in beiden Arten übereinstimmen (mit Ausnahme der Isoform *NAS3*). Das Ergebnis dieser Analyse war identisch zu den zuvor durchgeführten PCR-Reaktionen und wurden deshalb nicht gesondert dargestellt.

In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, daß auch auf Protein- und Metabolitebene ein signifikanter Unterschied zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* besteht

(Emiko Harada und Edda v. Roepenack-Lahaye, Weber *et al.*, 2004). Zusammen mit den Ergebnissen der heterologen Expression von *AtNAS2* in Hefe, die zu einer erhöhten Zinktoleranz führte (Stephan Clemens, Weber *et al.*, 2004), untermauern diese Daten die Hypothese, daß *NAS2* eine zentrale Rolle bei der Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* spielt. Aus diesem Grund sollten die molekularen Mechanismen für die erhöhte Expression von *AhNAS2* näher untersucht werden.

3.1.6 Identifikation der molekularen Mechanismen der erhöhten *AhNAS2* Expression

Nachdem geklärt werden konnte, daß das höhere *NAS*-Transkriptlevel in den Wurzeln von *A. halleri* auf die höhere Expression der *AhNAS2*-Isoform zurückzuführen ist, sollte untersucht werden, welcher molekulare Mechanismus für diesen Unterschied verantwortlich sein könnte. Diese Frage ist insofern sehr interessant, da bis dato keine Regulations- bzw. Signaltransduktions-Mechanismen identifiziert werden konnten, die für die Ausprägung eines Hyperakkumulationsphänotypes verantwortlich sind. Darüber hinaus ist das Wissen über die regulatorischen Prozesse, die bei Defizienzantworten (Mangel an Mikronährstoffen) oder der Regulation der Metallhomöostase ablaufen, sehr begrenzt.

3.1.6.1 Southern-Blot Analyse

Eine mögliche Erklärung für das höhere *AhNAS2*-Transkriptniveau in *A. halleri* könnte die Duplikation bzw. Amplifikation des gesamten Gens sein, wie sie z.B. für den CDF-Transporter MTP1 aus *A. halleri* gezeigt wurde (Dräger *et al.*, 2004). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein *Southern*-Blot durchgeführt. Für diese Analyse wurde genomische DNA aus dem Sproß beider Arten isoliert und mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Nach dem Auftrennen der DNA und einem Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Die Sequenz der Sonde war von der Isoform *NAS2* abgeleitet und umfaßte 378 bp vom 3'-Bereich der kodierenden Sequenz. Die Tatsache, daß das gesamte Genom von *A. thaliana* bereits sequenziert war, ermöglichte es - mittels eines „theoretischen Verdaus“- die Position der Banden vorherzusagen. Im Fall des *EcoRI*-Verdaus müßte eine Bande in der Höhe von ca. 1 kb zu detektieren sein. Der *HindIII*-Verdau sollte zu zwei detektierbaren Banden bei 0,6 kb bzw. ca. 2,8 kb führen, wie auch die *XhoI*-Spaltung (ca. 0,8 kb und ca. 5 kb). Das Ergebnis der tatsächlichen Autoradiographie ist in Abbildung 12 dargestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, daß bei verwendeten Spaltungen von genomischer DNA aus *A. thaliana* das prognostizierte Fragmentmuster zu sehen ist. Da bei dieser Hybridisierung niedrig stringente Bedingungen verwendet wurden, sind die zusätzlichen Banden beim *EcoRI*-Verdau (ca. 5 kb) und beim *HindIII*-Verdau (ca. 1 kb, sehr schwach) durch eine Kreuzhybridisierung mit der zu 85 % identischen Isoform *AtNAS1* zu erklären. Beim *XhoI* Verdau ist keine zusätzliche *NAS1*-Bande zu sehen, da diese auf der gleiche Höhe (ca. 5,5 kb) wie die obere *NAS2*-Bande liegt. Betrachtet man sich das Fragmentmuster von *A. halleri*, so ist deutlich zu erkennen, daß dieses praktisch identisch zu dem von *A. thaliana* ist. Lediglich beim *HindIII*-Verdau ist eine zusätzliche Bande zwischen 1 und 2 kb zu sehen. Dies ist dadurch zu erklären, daß das Gen *AhNAS1* eine *HindIII* Schnittstelle im Bereich der Sondenbindungsstelle hat und es somit zu zwei *NAS1*-Banden im *Southern*-Blot kommt. Mit

diesem Experiment konnte demnach gezeigt werden, daß die höhere Expression der *AhNAS2* Isoform in Wurzeln von *A. halleri* nicht auf einer Genduplikation beruht.

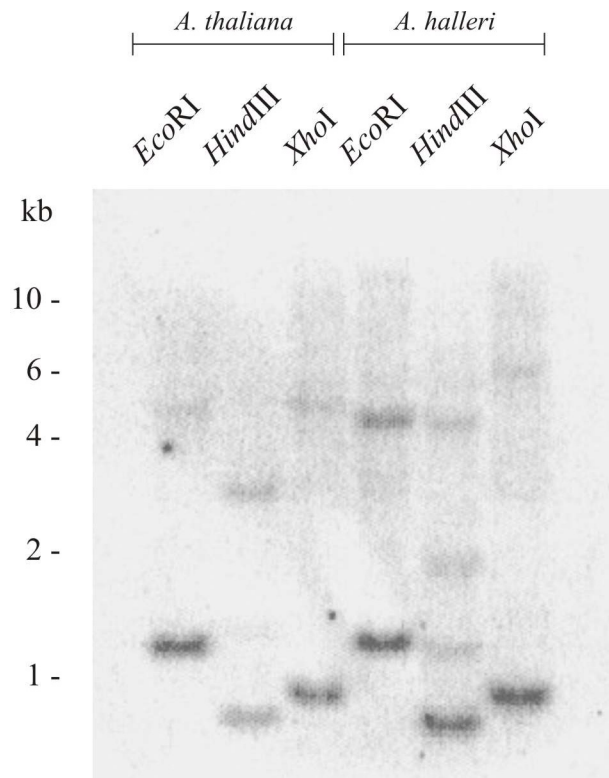


Abbildung 12: *Southern*-Blot Analyse des *NAS2*-Gens. Genomische DNA von *A. thaliana* und *A. halleri* wurde mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und parallel analysiert. Für die Hybridisierung wurde eine von *AtNAS2* abgeleitete Sonde verwendet.

3.1.7 Heterologe Expression von *AhNAS2* in *A. thaliana*

Nachdem mittels *Southern*-Blot-Analyse gezeigt werden konnte, daß die höhere Expression der *NAS2* Isoform in den Wurzeln von *A. halleri* nicht auf einer Genduplikation bzw. Amplifikation beruht, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob der Promotor des Gens für die höhere Expression verantwortlich ist. Um diese Frage zu klären,

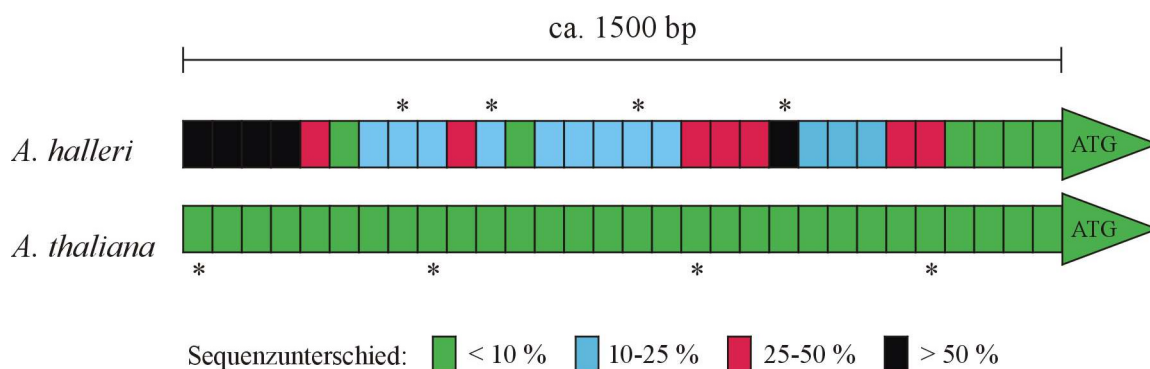


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Promotorbereiche der Gene *AtNAS2* und *AhNAS2*. Abschnitte mit unterschiedlicher Ähnlichkeit sind farblich differenziert. Jeder Abschnitt repräsentiert 50 bp. Der prozentuale Unterschied ist auf den *AtNAS2* Promotor bezogen. Beim Vergleich der Sequenzen ergeben sich in den mit * gekennzeichneten Bereichen Lücken von mindestens 4 Nucleotiden.

wurde der Bereich des Genoms von *A. halleri*, der 1500 Basenpaare vor dem Startcodon liegt, kloniert und sequenziert. Der anschließende Sequenzvergleich mit dem *A. thaliana*-Promotor ergab, daß sowohl Bereiche mit sehr geringen, als auch mit sehr großen Unterschieden zu finden sind (siehe Abbildung 13). Der Ähnlichkeitsgrad ist aber nicht abhängig von der Entfernung zum Startcodon und variiert sehr stark. Zusätzlich konnten Bereiche ausgemacht werden, bei denen im Rahmen des Sequenzvergleiches Lücken entstehen, die größer als vier Nukleotide sind. Dies ist insofern von Bedeutung, da die minimale Größe von Cis-Elementen vier Nukleotide beträgt. Die Verwendung von Computeralgorithmen (www.arabidopsis.org/tools/bulk/motiffinder/index.jsp) zur Identifizierung von fehlenden oder zusätzlichen Cis-Elementen im *A. halleri*-Promotor führte aber zu keinem verwertbarem Resultat.

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurde ein Konstrukt, das aus folgenden Abschnitten bestand, kloniert: Promotor (1 kb), kodierende Region und endogener Terminator (0,5 kb). Dieses Konstrukt wurde daraufhin in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen transformiert. Nach der Selektion transgener Pflanzen wurden die Wurzeln der T2-Generation in präliminären Experimenten mittels quantitativer realtime-PCR auf *NAS2*-Expression untersucht. Für diese Analyse wurden pro Linie je drei Pflanzen vereinigt und als eine Probe behandelt. Dieser Schritt war nötig, da die T2-Generation nicht ausschließlich aus homozygoten Pflanzen besteht. Die Vereinigung der Pflanzen sollte die Variation der Expression minimieren, die auf Homo- bzw. Heterozygotie zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der realtime-PCR sind in Abbildung 14 aufgeführt.

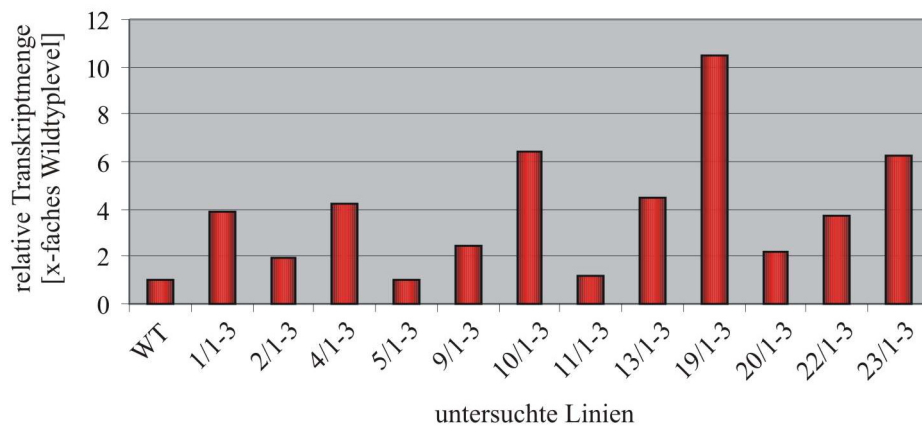


Abbildung 14: relative Transkriptlevel des *NAS2*-Gens in Bezug auf das Transkriptlevel in Wurzeln von *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen.

In dieser Darstellung ist zu erkennen, daß fast alle transgenen Linien ein erhöhtes *NAS2*-Transkriptlevel aufweisen. Im Fall der Linien 10 und 19 konnte sogar eine 6,4- bzw. 10,5fach höhere Expression gemessen werden. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, daß der *A. halleri* Promotor prinzipiell in *A. thaliana* funktionell ist und zumindest teilweise für das höhere Transkriptlevel verantwortlich sein könnte. Der Beweis dieser Hypothese kann aber erst durch die Analyse der T3-Generation und nach der Identifizierung von Pflanzen mit nur einem Integrationsereignis erbracht werden. Aufgrund der hier erhaltenen Daten ist es aber anzunehmen, daß der Promotor höchstwahrscheinlich nicht den alleinigen Grund für die höhere Expression der *NAS2* Isoform darstellt, da für *A. halleri*-Pflanzen mittels realtime-PCR ein etwa 50fach höheres Transkriptlevel detektiert wurde (Daten nicht gezeigt).

3.1.8 O-Acetylserin-(thiol)-Lyase 2 (= OAS A2)

Das dritte Kandidatengen, an dem weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden sollten, war eine O-Acetylserin-(thiol)-Lyase A2 (At3g22460). Dieses Enzym bildet zusammen mit der Serin-Acetyl-Transferase den Cystein-Synthase-Komplex, katalysiert jedoch nur in freier Form mit hoher Effektivität den letzten Schritt der Cysteinbiosynthese (Wirtz *et al.*, 2001). Es wird davon ausgegangen, daß in *A. thaliana* vier Isoformen für nahezu die gesamte OAS-TL Aktivität in der Zelle verantwortlich sind (Hell *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um ein mitochondriales (OAS C, At3g59760), ein plastidäres (OAS B, At2g43750) und zwei cytosolische Proteine (OAS A1/A2, At4g14880/At3g22460). Bei dem in den Microarray-Experimenten identifizierten Gen handelt es sich um die zweite cytosolische Isoform AOS-A2. Dieses Enzym wurde für eine nähere Charakterisierung ausgewählt, da Cystein für die Synthese von Glutathion benötigt wird, welches seinerseits den zentralen Baustein der Phytochelatine (PCs) darstellt (vgl. 1.5.2.4). PCs wiederum spielen eine wichtige Rolle bei der Cadmiumdetoxifizierung in *A. thaliana* (Howden *et al.*, 1995). Ferner konnte gezeigt werden, daß durch die Überexpression einer O-Acetylserin-(thiol)-Lyase die Cadmiumtoleranz in *A. thaliana* gesteigert werden kann (Domínguez-Solis *et al.*, 2001). Aus diesen Gründen sollte die OAS-TL in Hinblick auf den Cadmiumhyperakkumulationsphänotyp von *A. halleri* näher untersucht werden.

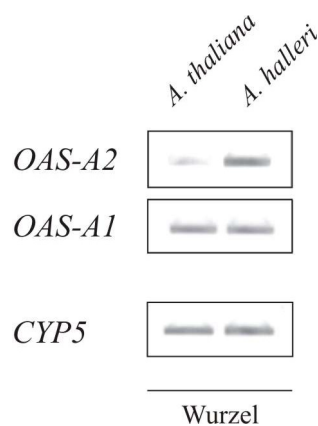


Abbildung 15:

RT-PCR-Analyse der *OAS-A1* (At4g14880) und *AOS-A2* (At3g22460) Transkriptlevel unter Kontrollbedingungen in den Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri*. Für die Amplifikation wurden isoformspezifische Primer (siehe Anhang) verwendet.

Zuerst sollte geklärt werden, ob beide cytosolischen Isoformen in den Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri* unterschiedlich exprimiert werden. Um diese Frage zu beantworten wurden RT-PCR Analysen mit genspezifischen Primern durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 15 dargestellt ist. Wie zu erkennen ist, konnte nur für die Isoform *OAS-A2* (At3g22460) ein Unterschied festgestellt werden, wohingegen das Expressionslevel der anderen Isoform in den Wurzeln beider Arten gleich ist. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß das Gesamttranskriptlevel der cytosolischen *OAS-TL* Gene in den Wurzeln von *A. halleri* erhöht ist. Die anschließende Analyse der Proteinmenge und Enzymaktivität ergab jedoch, daß auf dieser Ebene keine Unterschiede zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* zu detektieren waren (Harada, Weber *et al.*, 2004), weshalb die Untersuchungen an der *AOS-A2* nicht fortgeführt wurden.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung metallregulierter Gene

Neben der Aufklärung der molekularen Mechanismen des Hyperakkumulationsphänotyps in *A. halleri* bestand, wie erwähnt, ein weiteres Augenmerk dieser Arbeit auf der Identifizierung und näheren Charakterisierung von metallregulierten Genen. In diesem Zusammenhang waren sowohl Gene von Interesse, die in die generelle Metallantwort involviert sind, als auch Gene, die nur bei der Verteilung bzw. Detoxifizierung eines bestimmtem Metalls eine Rolle spielen.

3.2.1 cDNA-AFLP

Da zu Beginn dieser Arbeit für Pflanzen noch keine umfassenden Transkriptomanalysen – in Bezug auf metallregulierte Gene – durchgeführt worden waren, sollte zuerst mittels cDNA-AFLP eine möglichst große Anzahl an metallresponsiven Genen identifiziert werden. Nach der Selektion einiger interessanter Kandidatengene war eine nähere Charakterisierung geplant. Als experimentelles System wurde eine Schüttelkultur von *A. halleri*-Keimlingen in MS-Medium verwendet, der ein Gemisch aus verschiedenen Metallen zugesetzt wurde. Dieser Cocktail bestand in Anlehnung an die Experimente von Xiang & Oliver (1998) aus 500 μM Cu^{2+} , 500 μM Zn^{2+} und 100 μM Cd^{2+} . Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 8, 24 h) wurden die Pflanzen geerntet und für die cDNA-AFLP Analyse eingesetzt. Um das Problem der biologischen Variabilität zu reduzieren, wurden für die Analyse pro Zeitpunkt drei unabhängige Experimente vereinigt.

3.2.2 Statistische Auswertung

Insgesamt wurden 34 Primerkombinationen untersucht, was 12,5 % der 256 möglichen Kombinationen repräsentiert. Pro Primerkombination konnten durchschnittlich 31 \pm 10 Banden detektiert werden. Insgesamt wurden bei allen Primerkombinationen zusammen 1043 Banden detektiert, von denen ein Großteil (94 %) ein gleichbleibendes Expressionsmuster aufwies. Bei 4,9 % der Fragmente konnte eine Transkriptakkumulation nach Metallbehandlung festgestellt werden, wohingegen bei 0,6 % der Fragmente eine abnehmende Expression bzw. bei 0,5 % eine transiente Veränderung beobachtet wurde. Anschließend wurden die Fragmente, deren Expressionsmuster sich nach Metallbehandlung veränderten, aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Insgesamt wurden 115 Fragmente ausgewählt und weiter untersucht. (Anmerkung: bei diesem Schritt wurden zusätzlich auch Fragmente aus früheren Experimenten (Vess, 2003) analysiert). Nach der Reamplifikation wurden die Fragmente kloniert und pro Konstrukt vier unabhängige Klone sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab, daß für 91 Kandidaten mindestens eine verwertbare Sequenz erhalten wurde. Um die Effizienz der Klonierung bzw. Sequenzierung zu beurteilen, sollte die Anzahl der Klone pro Fragment ausgezählt werden. Für 43 Fragmente konnten vier, für 36 Fragmente drei und für zwölf Fragmente zwei oder weniger brauchbare Sequenzen ermittelt werden. In Anbetracht der Tatsache, daß gewisse Fragmente im Sequenziergel nur sehr schwach zu detektieren waren ist diese Effizienz als ausreichend einzustufen. Ein wichtiges Kriterium für die spätere Analyse und Beurteilung der Daten ist die Anzahl an übereinstimmenden Sequenzen pro kloniertem Fragment. Die Auswertung der Daten in Bezug auf diesen Parameter ergab, daß für 38 Klone mindestens drei und für weitere 30 Klone mindestens zwei übereinstimmende Sequenzen erhalten wurden. Der Vergleich der insgesamt 146 verschiedenen Sequenzen ergab, daß bei 139 DNA-Fragmenten die stärkste Ähnlichkeit

zu Sequenzen aus *A. thaliana* bestand, von denen 126 Fragmente kodierende Regionen repräsentieren. Bei den „nicht-thaliana“ Fragmenten wurde eine Ähnlichkeit zu *Mus musculus* (Maus), *Musa acuminata* (Banane) bzw. *Oryza sativa* (Reis)-Sequenzen festgestellt.

Nach der Bestimmung der einzelnen Sequenzen wurden die *A. thaliana*-Fragmente einer Klassifizierung unterzogen - basierend auf der TAIR-Datenbank (www.arabidopsis.org/info/ontologies/). Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 12 aufgelistet. Um eine bessere Einschätzung der Verteilung zu ermöglichen, wurden ebenfalls alle zur Zeit annotierten Gene des *A. thaliana*-Genoms dieser Klassifizierung unterzogen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der letzten Spalte der Tabelle 12 aufgelistet. Darüber hinaus sind jeweils die drei Kategorien in der Tabelle farblich markiert, die im Vergleich zum gesamten Genom am stärksten über- (= grün) bzw. unterrepräsentiert (= blau) sind.

Tabelle 12: Klassifizierung der beim cDNA-AFLP identifizierten DNA-Sequenzen. Zum Vergleich wurde auch der Anteil der jeweiligen Gruppen am gesamten *A. thaliana*-Genom aufgeführt. Die drei Kategorien, die beim cDNA-AFLP am stärksten überrepräsentiert waren, sind grün unterlegt. Blau gekennzeichnet sind die drei am stärksten unterrepräsentierten Kategorien.

Kategorie	cDNA-AFLP	Anteil am Genom
andere metabolische Prozesse	30,6 %	21,6 %
unbekannte Funktion	14,6 %	26,5 %
andere physiologische Prozesse	10,3 %	8,8 %
Protein-Metabolismus	9,3 %	8,6 %
abiotische oder biotische Streßantwort	6,4 %	2,7 %
generelle Streßantwort	4,3 %	2,1 %
Elektronentransport und Energie	3,6 %	3,1 %
Transport	3,2 %	6,5 %
andere zelluläre Prozesse	3,2 %	3,1 %
andere biologische Prozesse	2,8 %	4,8 %
Zellorganisation und Biogenese	2,8 %	1,6 %
Signaltransduktion	2,5 %	2,1 %
Entwicklung	2,5 %	1,9 %
Transkription	2,1 %	4,4 %
DNA- und RNA-Metabolismus	1,8 %	2,6 %

Das Hauptanliegen der cDNA-AFLP-Analyse war die Aufdeckung von Signaltransduktionskaskaden in der pflanzlichen Metallantwort. Aus diesem Grund waren Gene, die in der Kategorie „Signaltransduktion“ und „abiotische oder biotische Streßantwort“ eingeordnet wurden von besonderem Interesse. Wie man in Tabelle 12 erkennen kann, ist die Gruppe Signaltransduktion mit 2,1 % stark unterrepräsentiert. Im Gegensatz dazu sind Gene der Kategorie „abiotische oder biotische Streßantwort“ mit 6,4 % relativ häufig identifiziert worden.

3.2.3 Überprüfung des Expressionsmusters mittels RT-PCR

Um die Ergebnisse der cDNA-AFLP Analyse zu bestätigen, wurde eine Reihe von Genen ausgewählt, deren Expressionsprofile genauer untersucht werden sollten. Ein zentrales Kriterium für die Auswahl der Kandidatengene war, wie oben erwähnt, deren mögliche Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen. Alle untersuchten Kandidaten sind in Tabelle 13 aufgelistet. Neben einigen Transkriptionsfaktoren (z.B. WRKY) wurde auch ein RAS-ähnliches Protein ausgewählt, da bekannt ist, daß Vertreter dieser Proteinfamilie an der Steuerung zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt sind (Olson & Marais, 2001). Des weiteren wurden zwei calmodulinähnliche Proteine näher untersucht, da bekannt war, daß diese

Gruppe von Proteinen eine Rolle bei abiotischen Streßantworten (z.B. Kälte, oxidativer Streß) spielt (Knight & Knight, 2001).

Tabelle 13: Zusammenstellung der Kandidatengene, deren Expressionsmuster mittels RT-PCR analysiert wurde

AGI-Code	Genprodukt	cDNA-AFLP (Keimlinge)	RT-PCR (Wurzel)	spezifische Induktion
At5g42380	Calmodulin-ähnliches Protein	↑	↑	+
At1g76650	putatives Calmodulin	↑	↑	+
At3g18820	RAS-ähnliches Protein	↑	-	-
At1g35710	Rezeptorkinase-ähnliches Protein	↑	-	-
At5g06950	Transkriptionsfaktor	↑	-	-
At4g31550	WRKY11	↑	-	-
At4g31800	WRKY18	↑	↑	+

Mit Hilfe von RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, daß drei der sieben untersuchten Gene eine Induktion nach Metallbehandlung zeigten (siehe Abbildung 16). Bei den restlichen Kandidaten konnte nach Metallstreß keine erhöhte Transkriptakkumulation in den Wurzeln gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Auf eine exakte Bestätigung der cDNA-AFLP Ergebnisse (= Schüttelkultur, Analyse von Keimlingen) wurde verzichtet, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine strategische Fokussierung auf das Wurzelgewebe verfolgt wurde.

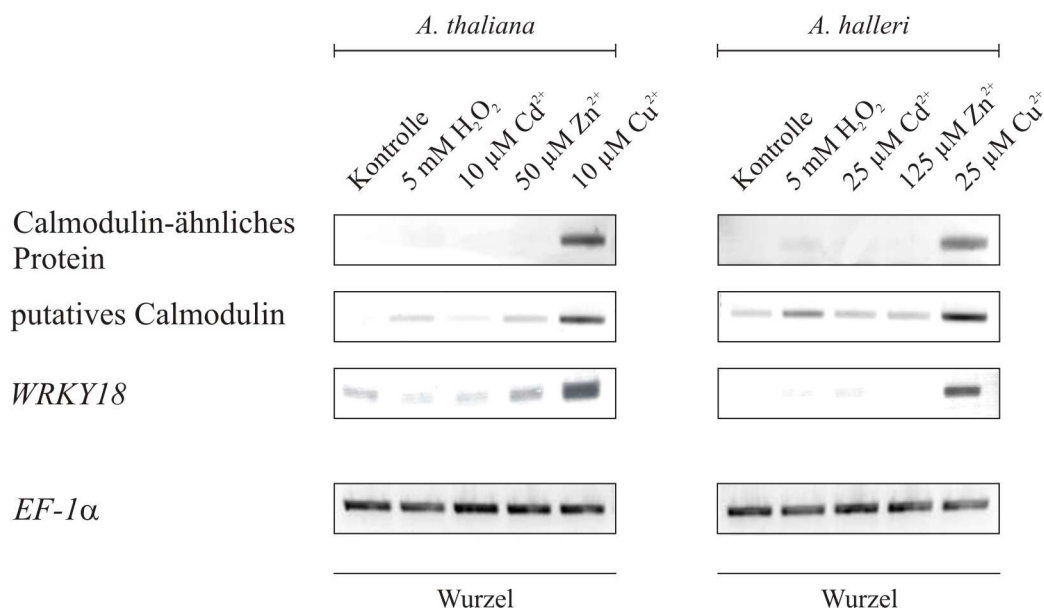


Abbildung 16: RT-PCR mit RNA aus Wurzeln hydroponisch kultivierter Pflanzen. In diesen Versuchen wurden sowohl *A. thaliana*- als auch *A. halleri*-Pflanzen getestet. Die Pflanzen wurden für je 2 Stunden mit 5 mM H₂O₂, 10 µM Cd²⁺, 50 µM Zn²⁺ oder 10 µM Cu²⁺ (*A. thaliana*) bzw. mit 5 mM H₂O₂, 25 µM Cd²⁺, 125 µM Zn²⁺ oder 25 µM Cu²⁺ (*A. halleri*) behandelt. Die Transkriptakkumulation der folgenden Gene wurde mit Hilfe genspezifischer Primer (siehe Anhang) nachgewiesen: Calmodulin-ähnliches Protein (At5g42380), putatives Calmodulin (At1g76650), *WRKY18* (At4g31800).

Neben der unabhängigen Bestätigung des cDNA-AFLPs konnte dieses Experiment zeigen, daß die Gene At5g42380 (Calmodulin-ähnliches Protein), At1g76650 (putatives Calmodulin) und At4g31800 (*WRKY18*) die stärkste Transkriptakkumulation nach Kupferstreß zeigten. In weiteren RT-PCR Experimenten (siehe Abbildung 17) konnte gezeigt werden, daß die beiden Gene At5g42380 und At1g76650 schon bei sehr niedrigen Kupferkonzentrationen responsiv

waren, wohingegen für das Gen At4g31800, unter den getesteten Bedingungen, keine veränderte Transkriptakkumulation gemessen werden konnte.

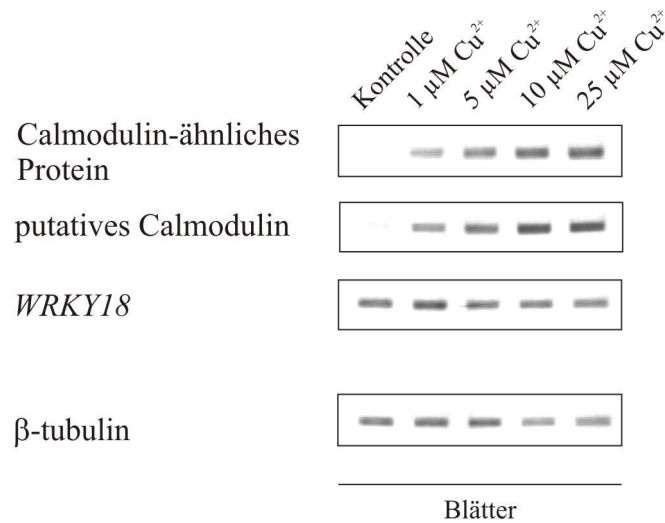


Abbildung 17: RT-PCR Experimente mit RNA aus „detached leaves“-Experimenten. Die Blätter wurden für zwei Stunden mit unterschiedlichen Cu²⁺-Konzentrationen gestreift. Die Transkriptakkumulation wurde mit Hilfe genspezifischer Primer (siehe Anhang) nachgewiesen.

3.2.4 Analyse von Knockout-Pflanzen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die At5g42380 (Calmodulin-ähnliches Protein), At1g76650 (putatives Calmodulin) und At4g31800 (*WRKY18*) eine kupferspezifische Responsivität zeigten, wurden diese Gene für weitere Untersuchungen ausgewählt. In diesen Experimenten sollte geklärt werden, ob sich der Verlust dieser Gene nachteilig auf die Kupfertoleranz auswirkt. Um dies zu testen, sollten Knockout-Pflanzen mittels Wurzelwachstumsversuchen untersucht werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung dieser Experimente ist die Verwendung von Pflanzen, die in Bezug auf das ausgeschaltete Gen homozygot sind. Im folgenden sollen diese Pflanzen als homozygote Knockout-Pflanzen bezeichnet werden. Um diese Pflanzen zu selektieren, mußten zuerst putative Knockout-Pflanzen (Alonso *et al.*, 2003) auf eine korrekte Insertion der T-DNA untersucht und im zweiten Schritt die Homozygotie bestätigt werden. Für die Bestätigung der Insertion sollte eine PCR unter Verwendung eines genspezifischen und eines T-DNA spezifischen Primers durchgeführt werden. Da diese Reaktion nur bei einer korrekten Vorhersage zu einem Produkt führt, kann mit dieser Methode die Richtigkeit einer Vorhersage überprüft werden. Als Matrize für die PCR-Reaktion diente genomische DNA, die aus den Blättern der Pflanzen isoliert wurde. Die Analyse der drei putativen Knockout-Linien ergab, daß die Vorhersagen für die Linien SALK_002410 (= At5g42380) und SALK_001571 (= At1g76650) richtig waren, wohingegen bei der Linie Salk_050079 (= At4g31800) keine Insertion im *WRKY18*-Gen detektiert werden konnte. Die anschließende Sequenzierung der amplifizierten Fragmente ermöglichte es, die exakte Insertionsstelle der T-DNA zu ermitteln (siehe Abbildung 18).

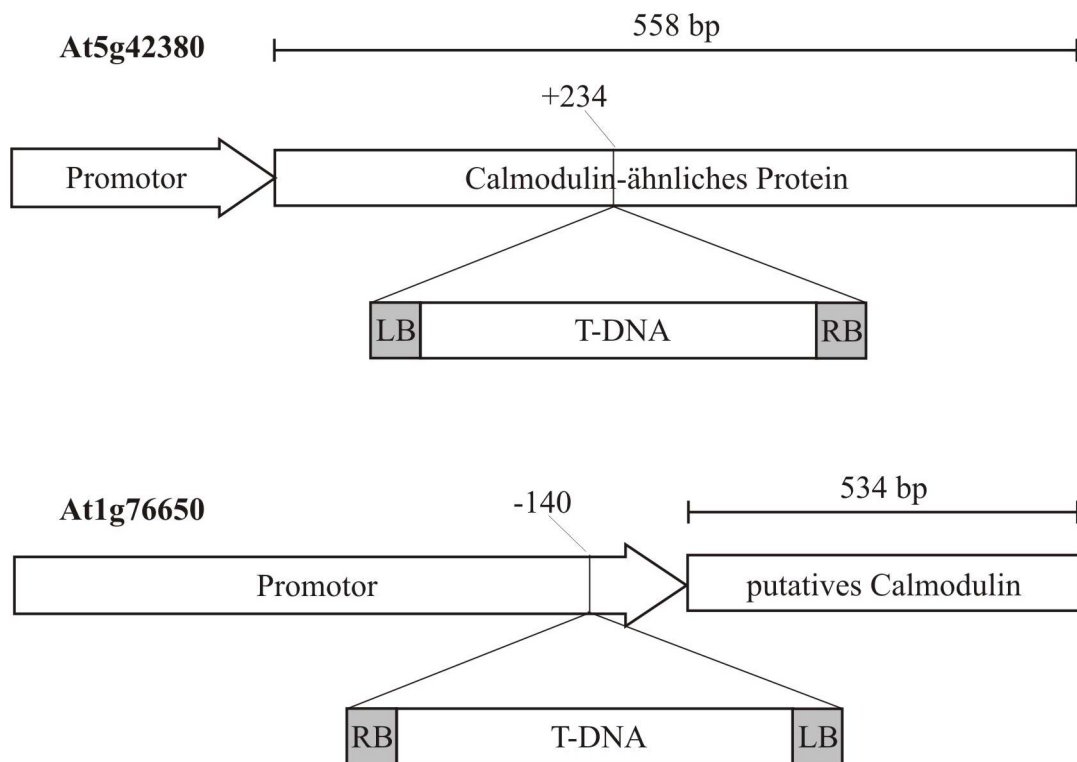


Abbildung 18: Insertionsstellen der T-DNA in den untersuchten Linien. In der oberen Hälfte ist Linie SALK_002410 (= At5g42380), in der unteren Hälfte Linie SALK_001571 (= At1g76650) dargestellt. LB = „left border“, RB = „right border“.

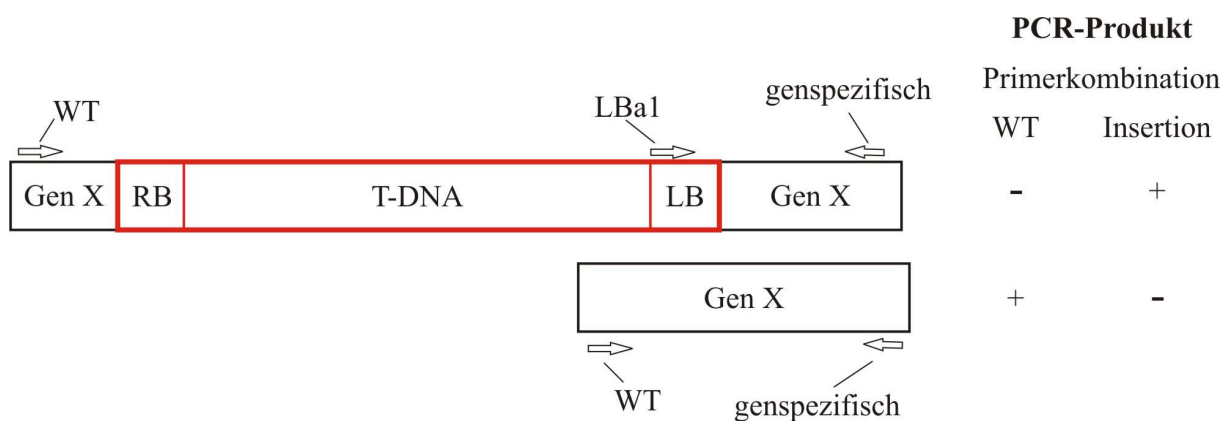


Abbildung 19: Prinzip der Knockout-Identifikation mittels PCR. In der oberen Hälfte der Graphik ist die Situation in einer Knockout-Pflanze dargestellt, wohingegen die untere Hälfte der Graphik die Situation in der WT-Pflanze widerspiegelt. WT-Primerkombination: WT + genspezifisch; Insertions-Primerkombination: LbaI + genspezifisch. Die + bzw. - Zeichen geben an, ob bei der PCR-Reaktion eine Bande entstehen wird.

Im nächsten Schritt mußten nun Pflanzen identifiziert werden, die in Bezug auf das abgeschaltete Gen homozygot waren. Zu diesem Zweck wurden die Samen der als positiv getesteten Pflanzen ausgesät und insgesamt zehn der daraus entstandenen Pflanzen mittels PCR untersucht. Bei homozygoten Pflanzen sollte folgendes PCR-Profil zu sehen sein (siehe Abbildung 19): Mit der WT-Primerkombination sollte es zu keiner Produktbildung kommen, wohingegen mit der Insertions-Primerkombination eine Bande entstehen sollte. Wie man in

Abbildung 20 erkennen kann, war es möglich, für beide Insertionslinien homozygote Pflanzen zu identifizieren. Die Samen dieser Pflanzen wurden dann im Anschluß für Wurzelwachstumsversuche verwendet.

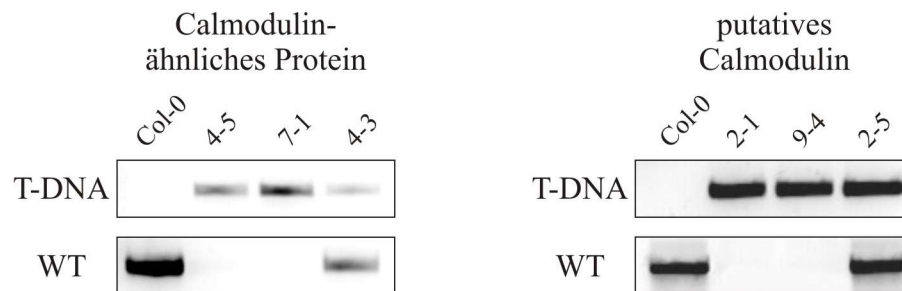


Abbildung 20: PCR-Analyse von homozygoten bzw. heterozygoten Knockout-Pflanzen. T-DNA steht für die T-DNA-spezifische Primerkombination und WT für die Wildtyp-spezifische Primerkombination. Auf der linken Seite ist die Analyse von At5g42380 Knockout-Pflanzen (Calmodulin-ähnliches Protein), auf der rechten Seite von At1g76650 Knockout-Pflanzen (putatives Calmodulin) dargestellt. Col-0 = Wildtyp, z.B. 4-5 = Knockout Linie. Es sind für beide Gene neben der Wildtyp Kontrolle jeweils zwei homozygote (nur bei T-DNA eine Bande) und eine heterozygote (bei WT und T-DNA eine Bande) Linie dargestellt.

Um sicherzustellen, daß es in den Knockout Pflanzen zu keiner Expression des inaktivierten Gens kommt, wurden Blätter der Pflanzen gerntet und für „detached leaves“-Versuche verwendet. Bei diesem Test wurden die Blätter für zwei Stunden mit 250 μM Cu^{2+} behandelt und anschließend mittels RT-PCR auf Transkriptakkumulation analysiert. Für diese Amplifikation des Calmodulin-ähnlichen Proteins wurden Primer verwendet, von denen einer stromaufwärts und einer stromabwärts der T-DNA Insertionsstelle bindet. Im Fall des putativen Calmodulins wurde eine Primerkombination gewählt, die 417 bp aus dem 3'-Bereich der Kodierenden Sequenz amplifiziert (siehe Anhang). Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß in den Linien 4-5 und 7-1 selbst nach Kupferbehandlung kein Transkript des Gens At5g42380 (Calmodulin-ähnliches Protein) zu detektieren war (siehe Abbildung 21). Durch die Responsivität des putativen Calmodulins konnte darüber hinaus belegt werden, daß die Kupferbehandlung eine Streßantwort auslöst. Somit war der „Knockout-Status“ dieser Pflanzen zweifelsfrei bestätigt.

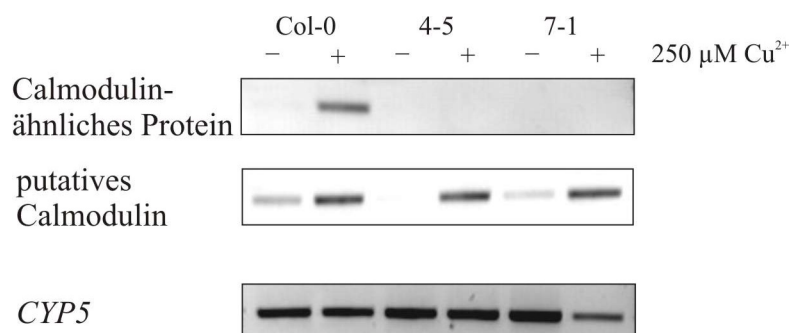


Abbildung 21: RT-PCR Analyse von „detached leaves“-Experimenten. Es wurde die Expression der Gene At5g42380 (Calmodulin-ähnliches Protein) und At1g76650 (putatives Calmodulin) unter Kontroll- und Kupferstreßbedingungen untersucht. Neben einer Wildtyplinie (Col-0) wurden zwei Knockoutlinien (4-5; 7-1) untersucht. *CYP5* wurde als konstitutive Kontrolle verwendet.

Dieselbe Untersuchung wurde auch mit den Pflanzen durchgeführt, die homozygot bezüglich einer Insertion im Gen At1g76650 (putatives Calmodulin) sein sollten. Wie man in Abbildung 22 erkennen kann, erfolgt unter Kupferstreß keine Expression des Gens At1g76650 in den untersuchten Pflanzen 2-1 und 9-4, wohingegen das Gens At5g42380 (Calmodulin-ähnliches Protein) exprimiert wurde. Dies bedeutete, daß auch in diesem Fall der „Knockout-Status“ zweifelsfrei dokumentiert werden konnte.

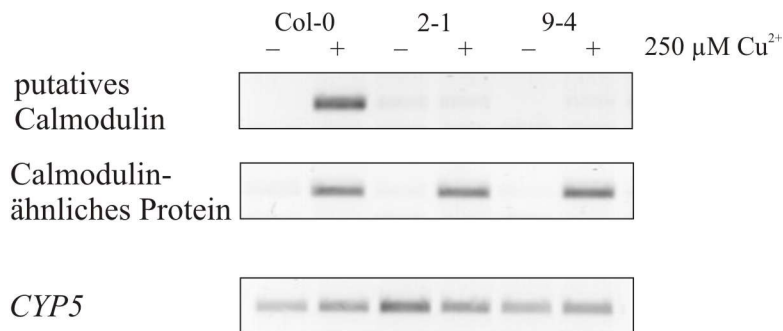


Abbildung 22: RT-PCR Analyse von „detached leaves“-Experimenten. Es wurde die Expression der Gene At1g76650 (putatives Calmodulin) und At5g42380 (Calmodulin-ähnliches Protein) unter Kontroll- und Kupferstreßbedingungen untersucht. Neben einer Wildtyplinie (Col-0) wurden zwei Knockout-Linien (2-1; 9-4) untersucht. *CYP5* wurde als konstitutive Kontrolle verwendet.

3.2.5 Wurzelwachstumsversuche

Nachdem es möglich war, für zwei der Kandidaten-Gene homozygote Knockout-Linien zu selektieren, sollte nun geklärt werden, ob sich der Verlust eines Gens positiv oder negativ auf das Wachstum von Keimlingen unter Schwermetallstreß auswirkt. Zu diesem Zweck wurden sterile Samen von Wildtyp- und Knockout-Pflanzen auf Petrischalen mit modifiziertem Hoaglandmedium ausgelegt und unter Dauerlicht kultiviert. Den Platten wurde Cu²⁺ in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 30 µM, 50 µM) zugegeben, um unterschiedliche Streßbedingungen zu schaffen. Nach 10-14 Tagen wurde die Wurzellänge der Keimlinge bestimmt.

Die Knockout-Pflanzen beider Gene zeigten unter Kontrollbedingungen ein normales Wachstum. Darüber hinaus konnten sowohl für die Pflanzenlinien 2-1 und 9-4 (At1g76650 KO), als auch für die Pflanzen 4-5 und 7-1 (At5g42380 KO) keine Veränderung des Wurzelwachstums unter den getesteten Bedingungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch in Bezug auf Sproßentwicklung und Chlorophyllgehalt konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, daß der Verlust eines dieser beiden Gene – unter den getesteten Bedingungen – keinen negativen oder positiven Einfluß auf die Kupfertoleranz der Pflanzen hat.

3.3 Microarray

Aufgrund der Tatsache, daß im Laufe dieser Arbeit die Microarray-Technologie verfügbar wurde, sollten parallel zur cDNA-AFLP Analyse auch Affymetrix-Microarrays zur Untersuchung des Transkriptoms herangezogen werden. Im Gegensatz zum cDNA-AFLP wurden jedoch keine Schüttelkulturen verwendet, sondern hydroponisch angezogene

Pflanzen. Dieses System, das im Laufe dieser Arbeit etabliert wurde, ermöglicht es, verschiedene Gewebe, wie z.B. Wurzel und Sproß, getrennt zu analysieren. Darüber hinaus ist – im Gegensatz zu in Erde angezogenen Pflanzen – eine definierte Applikation von Schwermetallen möglich. Für die Transkriptomanalyse wurden nur die Wurzeln der Pflanzen herangezogen, da in diesem Gewebe die ersten Streßantworten ablaufen und ein Startpunkt für die Streßbehandlung leicht zu definieren ist. Dieser Umstand war insofern sehr wichtig, da das Hauptaugenmerk dieser Untersuchungen die Identifizierung von Genen der frühen Streßantwort war. Bei Analysen des Sproßes ist jedoch dieser definierte Startpunkt – aufgrund der variablen Transportgeschwindigkeit innerhalb der Pflanze – nur sehr schwer zu ermitteln. Ein weiterer Aspekt der Versuche bestand darin, Gemeinsamkeiten und auch Unterschiede bei der transkriptionellen Antwort auf zwei verschiedene Schwermetalle zu identifizieren. Deshalb wurde für die Behandlung kein Cocktail von Metallen verwendet, sondern Cu^{2+} und Cd^{2+} einzeln appliziert. Für diese Versuche wurden diese Metalle ausgewählt, da sie sich zum einen in ihrer Eigenschaft, oxidativen Streß auszulösen, stark unterscheiden (siehe 1.1 und 1.2) und zum anderen ein essentielles und ein nicht-essentielles Schwermetall repräsentieren.

3.3.1 Evaluierung der Streßbehandlung mittels AAS (Atomabsorptionsspektrometrie)

Wie bereits erwähnt, sollten die Microarrayuntersuchungen an hydroponisch kultivierten Pflanzen durchgeführt werden. Da sich dieses Kultivierungssystem fundamental von den beim cDNA-AFLP verwendeten Schüttelkulturen unterscheidet, war es nötig, einige Parameter der Streßbehandlung zu modifizieren. Neben dem Verzicht auf die Applikation eines Metallgemisches mußten ebenfalls, aufgrund der unterschiedlichen Kulturmedien, die verwendeten Konzentrationen geändert werden.

Für die Cadmiumbehandlung sollten Konzentrationen gewählt werden, die im subtoxischen Bereich lagen und gleichzeitig zu einer vergleichbaren Cadmiumkonzentration in den Wurzeln führen. Da aufgrund von Wurzelwachstumsversuchen bekannt war (Becher, 2003), daß die Toxizitätsschwelle in 1/10 Hoagland-Medium bei *A. thaliana* ca. $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ und bei *A. halleri* ca. $25 \mu\text{M Cd}^{2+}$ beträgt, wurden diese beiden Konzentrationen für die Aufnahmeversuche verwendet. Nach Beendigung der zweistündigen Behandlung wurden die Wurzeln zuerst mehrmals gewaschen, um zellwandgebundene Schwermetalle zu entfernen, die die spätere Messung verfälschen würden. Nach dem Trocknen und Aufschließen der Proben wurden im Anschluß die Metallgehalte mittels Atomabsorptionsspektrometrie ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt und repräsentieren drei unabhängige Experimente, bei denen pro Experiment drei (*A. thaliana*) bzw. zwei Pflanzen (*A. halleri*) zu einer Probe vereinigt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, daß bereits nach zwei Stunden eine messbare Akkumulation von Cadmium in den Wurzeln beider Spezies stattfindet. Diese Akkumulation ist in beiden Spezies dosisabhängig. Bei einem direkten Vergleich der beiden Spezies wird deutlich, daß bei einer Behandlung mit $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ in *A. thaliana* eine größere Menge an Cadmium ($570 \pm 70 \text{ ng Cd}^{2+}/\text{mg TG}$) akkumuliert im Vergleich zur cadmiumtoleranten Pflanze *A. halleri* ($290 \pm 8 \text{ ng Cd}^{2+}/\text{mg TG}$). Dieser Trend ist auch bei der höheren Cadmiumkonzentration zu beobachten (*A. thaliana*: $1226 \pm 225 \text{ ng Cd}^{2+}/\text{mg TG}$, *A. halleri*: $546 \pm 36 \text{ ng Cd}^{2+}/\text{mg TG}$). Darüberhinaus ist zu erkennen, daß nach einer Behandlung mit $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ in *A. thaliana* ungefähr die gleiche Menge Cadmium akkumuliert, wie nach einer Behandlung von *A. halleri* mit $25 \mu\text{M Cd}^{2+}$. Basierend auf diesen

Ergebnissen, wurden die hydroponischen Kulturen für die Microarray-Experimente mit $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (*A. thaliana*) bzw. $25 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (*A. halleri*) behandelt.

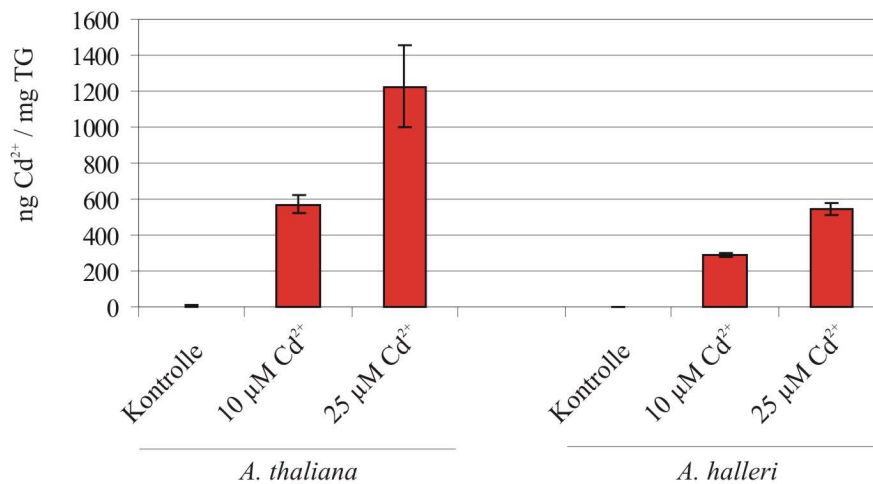


Abbildung 23: Cadmiumgehalte in den Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri*. Die Bestimmung erfolgte mittels Atomabsorptionsspektrometrie. Die dargestellten Daten repräsentieren je drei unabhängige Experimente.

Neben der Identifikation von cadmiumregulierten Genen sollten mit Hilfe der Microarray-Experimente auch vergleichende Studien über die Wirkung verschiedener Schwermetalle durchgeführt werden. Für diesen Vergleich wurden Pflanzen ebenfalls für zwei Stunden mit $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$ behandelt. Da es in der Literatur keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Kupfertoleranz zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* gibt, wurden beide Pflanzen mit der gleichen Konzentration behandelt. Um zusätzliche physiologische Informationen über die Kupferstreßantwort zu erhalten, wurde die Aufnahme von Kupfer in die Wurzeln beider Spezies ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 24 dargestellt.

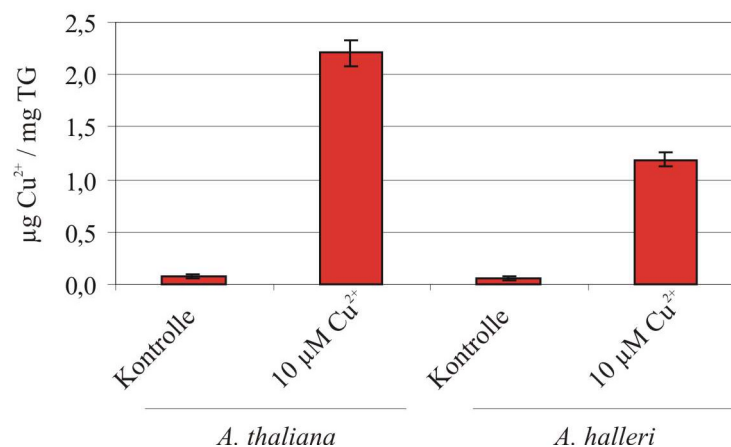


Abbildung 24: Kupfergehalt in den Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri* unter Kontrollbedingungen und Kupferstreß. Die Ergebnisse repräsentieren je drei unabhängige Experimente.

Bei der Bestimmung der Kupfermengen konnte festgestellt werden, daß unter Kontrollbedingungen in beiden Arten mit $0,08 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mg TG}$ (*A. thaliana*) und $0,05 \mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mg TG}$ unterschiedliche Kupfermengen vorhanden sind. Nach der Kupferbehandlung akkumulierte in

den Wurzeln von *A. thaliana* nach zwei Stunden mit 2,2 µg Cu²⁺/mg TG fast doppelt soviel Kupfer wie in Wurzeln von *A. halleri* (1,19 µg Cu²⁺/mg TG). Ob der Grund für diesen Unterschied in einer niedrigeren Aufnahme- oder einer schnelleren Translokation in den Sproß zu suchen ist, kann mit den durchgeführten Experimenten jedoch nicht beantwortet werden.

3.3.2 Transkriptomanalyse mittels Affymetrix-Microarrays

Für die Microarray-Analysen der beiden Arten *A. thaliana* und *A. halleri* wurden hydroponisch kultivierte Pflanzen für zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Cd²⁺ und Cu²⁺ (siehe Tabelle 14) behandelt. Darüber hinaus wurden für jede Art fünffach erhöhte Cd²⁺-Konzentrationen (50 µM bzw. 125 µM) verwendet, um eine toxische Belastung zu erzeugen. Diese Bedingungen sollten es ermöglichen, zusätzlich zu dem Vergleich Cadmium versus Kupfer, auch Effekte toxischer und subtoxischer Dosen gegenüberzustellen. Bei allen Streßbehandlungen wurden die Wurzeln nach zwei Stunden geerntet und RNA aus diesen isoliert. Danach wurde die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Synthese von markierter cRNA, die zur Hybridisierung der Affymetrix-Microarrays verwendet wurde. Nach dem Färben und Scannen der Microarrays wurde die Daten mit Hilfe des Programms GeneChip Suite 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) normalisiert. Hierbei wurde der TGT-Wert für alle Chips auf 500 gesetzt. Alle übrigen Parameter wurden gemäß der Voreinstellungen übernommen.

Tabelle 14: Auflistung der durchgeführten Behandlung. Die Pflanzen wurden jeweils für zwei Stunden mit den verschiedenen Schwermetallen behandelt.

Spezies	Cd ²⁺	Cu ²⁺
<i>A. thaliana</i>	10 µM / 50 µM	10 µM
<i>A. halleri</i>	25 µM / 125 µM	10 µM

3.3.3 Datenauswertung

Nach der Normalisierung der Datensätze erfolgte die weitere Analyse der Daten mit Hilfe des Programms Microsoft[®] Excel 2000 (Microsoft, USA). Zu Beginn wurden diejenigen SONDENSÄTZE selektiert, die von GeneChip 5.0 als „present“ (= P) oder „marginal“ (= M) eingestuft wurden (vgl. 3.1.1). Da alle Experimente mindestens als Triplikate vorlagen, wurde zuerst der Mittelwert der P- bzw. M-SONDENSÄTZE bei den einzelnen Bedingungen ermittelt. Wie man in Abbildung 25 erkennen kann liegt, die Anzahl der P/M-SONDENSÄTZE bei allen *A. halleri*-Proben deutlich unter den Werten der *A. thaliana*-Experimente.

Nach der Identifizierung der verlässlichen SONDENSÄTZE wurde der Datensatz nochmals gefiltert, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Um eine realistische Berechnung der Induktionsfaktoren zu ermöglichen, wurden im Anschluß an die Normalisierung alle Signalwerte, die kleiner als 25 waren, auf 25 gesetzt (Kreps *et al.*, 2002). Der im Anschluß verwendete Filter wurde wie folgt definiert. Ein SONDENSATZ wird als induziert (bzw. reprimiert) eingestuft, wenn:

- i) er in der Behandlung (bzw. Kontrolle) als „present“ oder „marginal“ eingestuft wurde
- ii) sein Intensitätssignal mindestens zweifach höher (bzw. niedriger) ist als in der Vergleichsprobe
- iii) die beiden Bedingungen (a) und (b) in mindestens zwei von drei unabhängigen Experimenten erfüllt sind

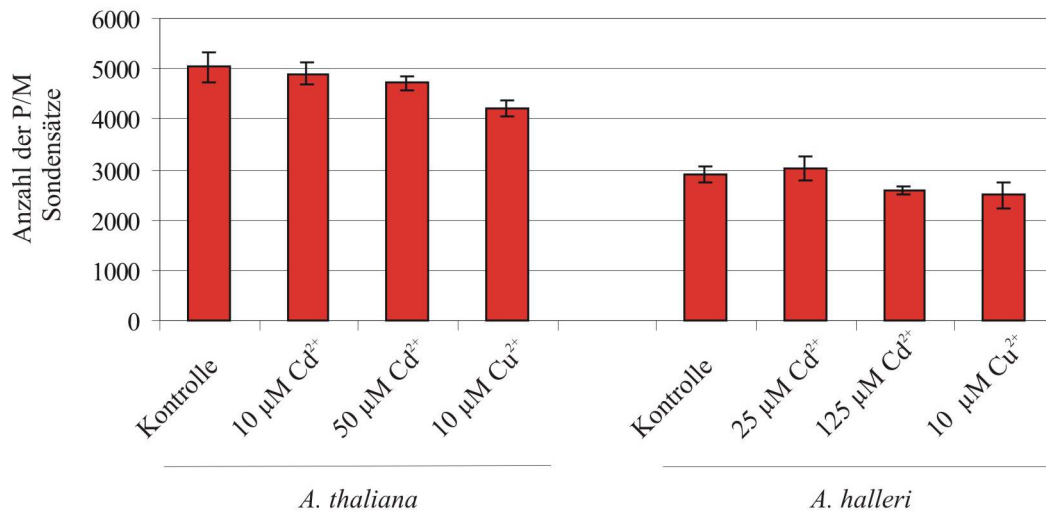


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Anzahl an Sondensätzen, die in den einzelnen Experimenten als „present“ oder „marginal“ eingestuft wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei Experimenten dargestellt. Bei den Proben Kontrolle (*A. thaliana*) und Kontrolle (*A. halleri*) wurden aus technischen Gründen vier (*A. thaliana*) bzw. fünf (*A. halleri*) unabhängige Experimente in die Auswertung einbezogen.

3.3.4 Identifizierung induzierter (bzw. reprimierter) Gene

3.3.4.1 Niedrig-Cadmium (N-Cd) und hoch-Cadmium (H-Cd) bei *A. thaliana*

Bei der Analyse der mit 10 µM Cadmium (= N-Cd) behandelten *A. thaliana*-Wurzeln konnten unter Verwendung des oben beschriebenen Filters 68 Sondensätze identifiziert werden, die eine mindestens zweifache Induktion zeigten (siehe Tabelle 15). Aufgrund der Tatsache, daß verschiedene Gene durch mehrere Sondensätze repräsentiert sind, reduziert sich die Zahl der damit erfassten Gene auf 66. Im folgenden sollen diese Gene als NCdI-Gruppe (Niedrig Cd²⁺ Induziert) bezeichnet werden. Bei der Analyse der *A. thaliana* N-Cd Experimente konnten darüber hinaus 27 Sondensätze herausgefiltert werden, die als mindestens zweifach reprimiert eingestuft wurden und die insgesamt 26 Gene repräsentieren.

Vergleicht man nun die induzierten Sondensätze der N-Cd Experimente mit denjenigen, die durch 50 µM Cd²⁺ (= H-Cd) induziert werden, so fällt auf, daß 50 Kandidaten in beiden Listen auftauchen. Die Gesamtzahl der als induziert eingestuften Sondensätze ist aber mit 257 deutlich höher. Da diese Cadmiumkonzentration bereits stark toxische Effekte bei *A. thaliana* hervorruft (Becher, 2003), sind Gene, die nur bei 50 µM Cadmium als induziert eingestuft sind, minder interessant. Weitaus wichtiger für die Cadmiumdetoxifikation scheinen Gene zu sein, die entweder ausschließlich bei 10 µM Cd²⁺ induziert sind oder in beiden Listen vorkommen und gleichzeitig ein dosisabhängiges⁴ Induktionsprofil aufweisen. Diese Gruppe von dosisabhängig induzierten Genen ist in Tabelle 15 grün unterlegt und soll im folgenden als DCdI (Dosisabhängig Cd²⁺ Induziert) bezeichnet werden. Die DCdI Gene stellen also eine Teilmenge der NCdI-Gene dar.

⁴ Eine Induktion wurde als dosisabhängig eingestuft, wenn der Quotient der Induktionsfaktoren (hoch Cadmium/niedrig Cadmium) größer als 1 war.

Tabelle 15: Zusammenstellung der Gene des NCDI-Gruppe. Die Gene, die eine dosisabhängige Induktion zeigten (= DCDI), sind grün unterlegt.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion	
			10 $\mu\text{M Cd}^{2+}$	50 $\mu\text{M Cd}^{2+}$
13279_s_at	At5g12020	Klasse 2 Hitzeschockprotein (17,6 kDa)	51,33	23,79
20323_at	At2g29500	kleines Hitzeschockprotein	11,97	16,34
13282_s_at	At4g25200	mitochondriales Hitzeschockprotein	11,66	30,28
13276_s_at	At1g53540	17.6 kDa Hitzeschockprotein	7,35	23,12
19640_at	At2g29460	putative GSH-Transferase	7,31	5,66
18451_s_at	At4g33710	PR1 ähnliches Protein	6,20	1,02
17514_s_at	At3g23240	ERF1	6,16	10,13
14320_at	At2g42360	ähnlich zu RING Zinkfinger-Protein	6,13	2,51
19178_at	At5g20230	BCBP (blue copper binding protein)	5,76	8,12
15404_at	At1g54050	Hitzeschockprotein (HSP 20)	5,42	30,87
13278_f_at	At5g12030	Hitzeschockprotein (17.6A)	4,92	5,60
18635_at	At2g43920	Thiolmethyltransferase	4,25	4,13
13277_i_at	At5g12030	Hitzeschockprotein (17.6A)	4,03	5,65
13627_at	At4g23700	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher (CHX17)	3,98	5,97
16603_s_at	At4g15550	Glucosyltransferase	3,90	3,33
20370_at	At2g29150	putative Tropinonreduktase	3,70	3,16
20246_s_at	At4g23250	Proteinkinase-ähnliches Protein	3,68	2,77
18508_s_at	At2g02010	Glutamatdecarboxylase	3,64	6,01
18876_at	At2g39980	Transferase	3,50	3,69
12475_at	At5g06730	putative Peroxidase	3,17	1,60
16130_s_at	At4g11370	RING-H2 Fingerprotein (RHA1a)	3,16	2,28
18930_at	At1g23740	Oxidoreduktase	3,15	1,86
14116_at	At5g26340	putativer Hexosetransporter	3,11	2,86
18228_at	At3g15356	Lectin-verwandtes Protein	3,10	2,88
14032_at	At4g37370	putatives Cytochrome P450	3,01	6,32
16609_s_at	At5g47220	EREBP-2	2,92	6,40
18591_at	At5g08790	NAM Proteinfamilie	2,90	11,85
16662_at	At4g26260	exprimiertes Protein	2,86	3,32
15665_s_at	At5g04340	Zinkfinger-Protein (C2H2-Typ)	2,83	4,12
15647_s_at	At4g14680	ATP-Sulfurylase	2,81	15,32
13015_s_at	At5g59820	Zinkfinger-Protein ZAT12	2,71	6,65
15341_at	At2g32200	hypothetisches Protein	2,64	1,10
16275_at	At1g09300	exprimiertes Protein	2,64	3,32
18753_s_at	At4g10500	Oxidoreduktase	2,59	0,87
13275_f_at	At3g46230	Klasse 1 Hitzeschockprotein (HSP 17.4)	2,43	8,91
12817_g_at	At1g78830	Mannose bindendes Protein	2,42	2,66
13656_at	At4g01870	exprimiertes Protein	2,41	2,62
13680_s_at	At1g55020	Lipoxygenase (LOX1)	2,41	2,11
18945_at	At1g59860	Klasse 1 Hitzeschockprotein (HSP 17.5)	2,33	12,60
13215_s_at	At1g67980	putative Caffeoyl-CoA 3-O-Methyltransferase	2,32	1,79
19848_s_at	At2g41100	TCH3	2,32	3,18
18217_g_at	At1g27730	Zinkfinger-Protein	2,29	8,71
12892_g_at	At4g11280	ACC-Synthase 6	2,28	7,30
16914_s_at	At4g11650	Osmotin-ähnliches Protein	2,28	2,27
16638_s_at	At3g28210	putatives Zinkfinger-Protein	2,22	9,37
14966_at	At2g45450	exprimiertes Protein	2,17	2,06
14964_at	At1g65500	exprimiertes Protein	2,16	2,52
18946_at	At5g39580	putative Peroxidase	2,16	4,20
12816_at	At1g78830	Mannose-bindendes Protein	2,15	3,75
13539_i_at	At3g47380	Pectinesterase-ähnliches Protein	2,15	3,32
18253_s_at	At1g76680	12-Oxophytodienoat-Reduktase (OPR1)	2,14	6,87
19991_at	At2g35980	ähnlich zu Harpin-induziertem Protein	2,09	2,99
16063_s_at	At4g17500	EREBP-1 (Frameshift)	2,07	3,48
15162_s_at	At3g04720	Hevein ähnliches Protein	2,04	1,48
12737_f_at	At3g23250	MYB-Transkriptionsfaktor (MYB15)	1,97	4,38

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion	
			10 μM Cd^{2+}	50 μM Cd^{2+}
18584_at	At1g10970	ZIP4	1,96	1,49
17805_at	At1g52130	ähnlich zu Myrosinase-bindendem Protein	1,94	1,85
14831_at	At4g33020	ZIP9	1,92	2,04
15646_s_at	At1g55920	Serin-Acetyltransferase	1,89	4,53
16003_s_at	At4g28390	putatives mitochondriales ADP/ATP-Trägerprotein	1,88	2,18
17533_s_at	At4g25810	Xyloglucan Endotransglycosylase (XTR-6)	1,84	2,87
17303_s_at	At2g38470	WRKY Transkriptionsfaktor	1,83	6,15
13211_s_at	At3g12500	Glycosyl-Hydrolase	1,76	1,48
15186_s_at	At1g62180	Thioredoxin (PAPS Reduktase)	1,75	3,16
17445_at	At4g23570	Phosphatase-ähnliches Protein	1,75	3,54
17742_g_at	At2g41700	ABC-Transporter	1,74	1,35
15582_s_at	At3g22370	alternative Oxidase 1a (AOX1A)	1,65	2,56
16173_s_at	At4g37430	Cytochrome P450	1,64	0,83

Tabelle 15 fortgesetzt

Im Anschluß an die Filterung der Daten wurden die NCdI-Gene mit Hilfe der TAIR-Datenbank in funktionelle Kategorien eingeteilt (siehe Tabelle 16). Da alle weiteren Klassifizierungen im Ergebnisteil auf der TAIR-Datenbank beruhen, soll dies im folgenden nicht mehr gesondert erwähnt werden. Parallel zur NCdI-Gruppe wurden auch alle Gene, die auf dem Affymetrix-Microarray vertreten sind, einer Klassifizierung unterzogen, um eine bessere Einschätzung der Daten zu ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Klassifizierung sind ebenfalls in Tabelle 16 aufgeführt. Des weiteren sind die drei deutlichsten Abweichungen von der Affymetrix-Microarray-Klassifizierung farblich hervorgehoben (grün = überrepräsentiert; blau = unterrepräsentiert).

Tabelle 16: Klassifizierung der NCdI-Gene aus *A. thaliana*. Zum Vergleich wurde auch der Anteil der jeweiligen Gruppen am Affymetrix-Microarray aufgeführt. Die drei Kategorien, die beim cDNA-AFLP am stärksten überrepräsentiert waren sind grün unterlegt. Blau gekennzeichnet sind die drei am stärksten unterrepräsentierten Kategorien.

Kategorie	Prozentsatz	Anteil am Microarray
andere metabolische Prozesse	16,8 %	25,3 %
abiotische oder biotische Streßantwort	16,2 %	4,2 %
andere physiologische Prozesse	14,7 %	11,0 %
generelle Streßantwort	14,1 %	2,9 %
Transport	9,9 %	6,8 %
unbekannte Funktion	7,9 %	14,0 %
andere biologische Prozesse	4,7 %	6,0 %
Transkription	4,2 %	5,3 %
Elektronentransport und Energie	3,7 %	3,4 %
Protein-Metabolismus	3,1 %	8,7 %
Signaltransduktion	1,6 %	2,4 %
Entwicklung	1,6 %	2,7 %
andere zelluläre Prozesse	1,0 %	3,5 %
Zellorganisation	0,5 %	1,9 %

Diese Klassifizierung zeigte, daß die beiden Gruppen „biotische/abiotische Streßantwort“ und „generelle Streßantwort“ mit 16,9 % bzw. 14,6 % den größten Anteil aller induzierten Gene ausmachten. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß diese Gruppen im Vergleich zum gesamten Genom extrem überrepräsentiert sind. Im Gegensatz dazu sind die beiden Gruppen „andere metabolische Prozesse“ und „unbekannte Funktion“ stark unterrepräsentiert. Eine weitere Auffälligkeit ist die starke Häufung von Hitzeschockproteinen

unter den am stärksten induzierten Genen. Neben den induzierten konnten auch 174 reprimierte SONDENSÄTZE im H-Cd Experiment identifiziert werden. Da bei dieser Konzentration schon toxische Effekte zu erwarten sind, ist die Anzahl der SONDENSÄTZE erwartungsgemäß deutlich höher als in den N-Cd Experimenten.

3.3.4.2 Kupfer bei *A. thaliana*

Neben den bereits erwähnten Cadmiumbehandlungen wurden die hydroponisch kultivierten Pflanzen auch mit 10 μM Cu^{2+} gestreßt. Die Anzahl der SONDENSÄTZE, die bei diesen Versuchen als induziert eingestuft wurden, ist mit 682 beträchtlich höher als bei beiden Cadmiumexperimenten. Ein weiterer Unterschied zwischen der Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Behandlung ist darüber hinaus, daß die höchsten Induktionsraten bis in den dreistelligen Bereich hineinreichten. Zum Beispiel konnte für BCBP (= **B**lue **C**opper **B**inding **P**rotein, At5g20230) eine Induktionsrate von 504 (Mittelwert aus drei Experimenten) ermittelt werden. Im Gegensatz dazu liegt die höchste Induktionsrate bei der äquimolaren Cd^{2+} -Behandlung bei 51 (Mittelwert aus drei Experimenten) für ein Hitzeschockprotein (At5g12020). Eine Klassifizierung der einzelnen Gene (siehe Tabelle 17), die bei Kupferstreß induziert wurden, ergab, daß die größte Gruppe dem Metabolismus zuzurechnen ist. Die zweitgrößte Gruppe enthält Gene mit unbekannter Funktion. Gene, die an der biotischen oder abiotischen Streßantwort beteiligt sind, nehmen mit 9,7 % den vierten Platz ein. Des weiteren sind in Tabelle 17 die drei stärksten Abweichungen von der Verteilung auf dem Microarray farblich hervorgehoben (grün = überrepräsentiert; blau = unterrepräsentiert).

Tabelle 17: Klassifizierung aller Gene, deren Expression in den Wurzeln von *A. thaliana* nach Kupferbehandlung induziert wurde. Zum Vergleich wurde auch der Anteil der jeweiligen Gruppen am Affymetrix-Microarray aufgeführt. Die drei Kategorien, die am stärksten überrepräsentiert waren, sind grün unterlegt. Blau gekennzeichnet sind die drei am stärksten unterrepräsentierten Kategorien.

Kategorie	Prozentsatz	Anteil am Microarray
andere metabolische Prozesse	24,8 %	25,3 %
unbekannte Funktion	12,2 %	14,0 %
Protein-Metabolismus	10,5 %	8,7 %
abiotische oder biotische Streßantwort	9,7 %	4,2 %
Transport	8,4 %	6,8 %
andere physiologische Prozesse	7,6 %	11,0 %
generelle Streßantwort	6,7 %	2,9 %
Transkription	5,9 %	5,3 %
Entwicklung	3,7 %	2,7 %
Elektronentransport oder Energie	3,0 %	3,4 %
Signaltransduktion	2,7 %	2,4 %
andere zelluläre Prozesse	2,6 %	3,5 %
DNA- oder RNA-Metabolismus	1,4 %	1,9 %
Zellorganisation	0,7 %	1,9 %
andere biologische Prozesse	0,4 %	6,0 %

Vergleichbar zu den Cadmiumexperimenten ist die stärkste Überrepräsentation bei den Kategorien „abiotische/biotische Streßantwort“ und „generelle Stessantwort“ zu beobachten. Neben der hohen Zahl an induzierten konnten auch 1239 reprimierte SONDENSÄTZE herausgefiltert werden. Die hohe Anzahl an reprimierten Genen erklärt zum Teil auch den signifikanten Rückgang an exprimierten Genen, der durch den niedrigeren P/M-Wert (siehe Abbildung 25) zum Ausdruck kommt.

Betrachtet man alle erhaltenen Datensätze der *A. thaliana*-Experimente, so ist eine wesentliche Erkenntnis dieses Vergleichs, daß bereits sehr niedrige Konzentrationen an Cu^{2+} zu dramatischen Veränderungen im Stoffwechsel führen, wohingegen die gleiche Konzentration an Cd^{2+} relativ geringe Verschiebungen im Expressionsprofil verursacht. Erwartungsgemäß war hingegen das Resultat, daß durch toxische Konzentrationen an Cd^{2+} stärkere Änderungen zu beobachten sind als durch subtoxische. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß ein großer Anteil der NCdI-Gene eine dosisabhängige Induktion zeigte.

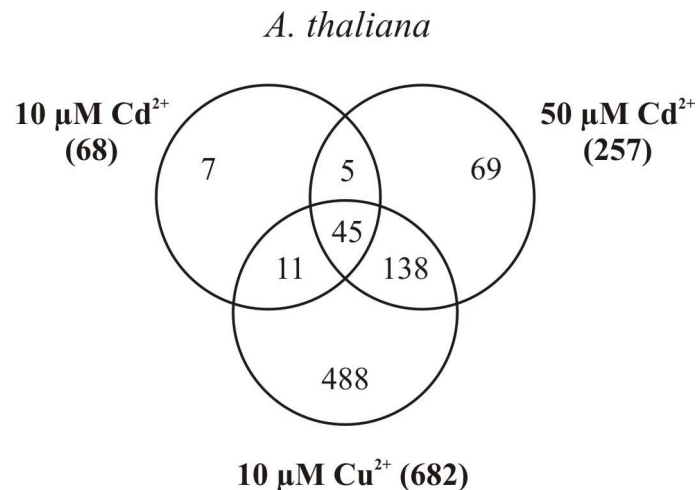


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Schnittmengen aller Experimente von *A. thaliana*. Bei dieser Zusammenstellung sind jeweils die als induziert eingestuft SONDENSÄTZE miteinander verglichen worden.

Tabelle 18: Auflistung von Genen der *A. thaliana* NCdI-Gruppe, die nicht durch Cu^{2+} induziert werden. Putative (Schwermetall-)Transporter sind grün unterlegt. Gene, die ebenfalls zur DCdI-Gruppe gehören, sind durch ein Pluszeichen gekennzeichnet.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	DCdI
13211_s_at	At3g12500	Glycosyl-Hydrolase	
14831_at	At4g33020	ZIP9	+
15162_s_at	At3g04720	Hevein ähnliches Protein	
15186_s_at	At1g62180	Thioredoxin (PAPS Reduktase)	+
16173_s_at	At4g37430	Cytochrome P450	
16275_at	At1g09300	exprimiertes Protein	+
16603_s_at	At4g15550	Glucosyltransferase	
16662_at	At4g26260	exprimiertes Protein	
17742_g_at	At2g41700	ABC-Transporter	+
18584_at	At1g10970	ZIP4	
18753_s_at	At4g10500	Oxidoreduktase	
18876_at	At2g39980	Transferase	+

Neben der getrennten Auswertung der einzelnen Metallbehandlungen ist ebenfalls die Identifikation übereinstimmender Expressionsmuster von großer Bedeutung, da sie einen Anhaltspunkt für konservierte Mechanismen der Streßantwort geben könnten. Bei einem Vergleich der einzelnen Experimente ist zu erkennen, daß 56 der SONDENSÄTZE aus dem Kupferexperiment auch bei der N-Cd Behandlung als induziert eingestuft sind. Bei einem Vergleich mit dem H-Cd Experiment ist eine Überlappung von 183 SONDENSÄTZEN zu beobachten. Filtert man die Gene heraus, die bei allen drei Behandlungen als induziert

eingestuft sind, so kommt man auf 45 Sondersätzen. Alle möglichen Gegenüberstellungen der *A. thaliana*-Experimente sind in Abbildung 26 zusammengefasst.

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Vergleiche ist, daß nur eine kleine Gruppe von 12 Genen (siehe Tabelle 18) zur NCdI-Gruppe gehört und gleichzeitig nicht durch Kupfer induziert wird. Diese Gene sind insofern interessant, da sie vielleicht in eine cadmiumspezifische Streßantwort involviert sein könnten. Außerdem ist zu erkennen, daß unter diesen Genen insgesamt drei Transporter zu finden sind, von denen zwei (ZIP4, ZIP9) als putative Schwermetalltransporter klassifiziert wurden (www.mips.gsf.de).

3.3.4.3 Niedrig-Cadmium (N-Cd) und hoch-Cadmium (H-Cd) bei *A. halleri*

Neben der Analyse des Expressionsprofils von *A. thaliana* war auch der Vergleich mit *A. halleri* eine wichtige Komponente der Auswertungsprozedur. Parallel zu *A. thaliana* wurden *A. halleri*-Pflanzen mit niedrigen und hohen Cd^{2+} -Konzentrationen bzw. mit Cu^{2+} behandelt. Eine Analyse der Cd^{2+} -behandelten Wurzeln der Spezies *A. halleri* ergab, daß bei

Tabelle 19: Zusammenstellung der Gene der NCdI-Gruppe. Gene, die eine dosisabhängige Induktion zeigen, sind grün unterlegt.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion	
			25 μM Cd^{2+}	125 μM Cd^{2+}
20489_at	At2g44840	EREBP	27,42	37,32
16924_s_at	At2g18020	ribosomales Protein	6,54	2,35
12688_at	At4g30100	exprimiertes Protein	5,48	4,77
12644_at	At1g67710	ARR11-ähnliches Protein	4,25	0,92
16817_s_at	At4g11280	ACC-Synthase 6	4,17	2,62
17381_at	At4g36500	exprimiertes Protein	3,99	3,75
17614_at	At4g07960	Glycosyltransferase	3,92	0,94
16539_s_at	At4g17490	ERF6	3,59	2,81
17219_s_at	At2g47680	RNA-Helikase	3,52	0,96
12614_at	At4g02790	exprimiertes Protein	3,36	0,53
16638_s_at	At3g28210	Zinkfinger-Protein	2,99	1,64
15431_at	At4g27280	EF-Hand Protein	2,97	4,91
16620_s_at	At5g57560	TCH4	2,95	6,40
16536_s_at	At5g47230	ERF5	2,93	5,26
18224_s_at	At4g21830	exprimiertes Protein	2,87	4,54
18751_f_at	At4g38620	MYB4	2,86	1,82
15665_s_at	At5g04340	Zinkfinger-Protein (C2H2-Typ)	2,80	3,29
14895_s_at	At4g17830	putative Aminoacylase	2,77	0,61
13015_s_at	At5g59820	Zinkfinger-Protein ZAT12	2,27	1,27
17705_i_at	At1g23680	OBP32pep-ähnliches Protein	2,19	0,89
16611_s_at	At5g13550	Sulfattransporter	2,16	14,99
18466_at	At1g10160	reverse Transkriptase	2,16	0,90
12730_f_at	At1g35515	MYB-Transkriptionsfaktor	2,12	1,67
17620_s_at	At2g42990	GDSL-Motiv Lipase/Hydrolase	2,11	2,70
12503_at	At2g33710	Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne	1,99	1,36
15203_s_at	At1g68840	Protein mit AP2-Domäne	1,99	1,75
14643_s_at	At2g03760	Steroid Sulfotransferase	1,98	4,21
14608_at	At1g13210	Hydrolase	1,94	1,78
17967_at	At3g46930	Proteinkinase	1,89	1,04
15647_s_at	At4g14680	ATP-Sulfurylase	1,84	2,18
20699_at	At2g45160	Scarecrow Transkriptionsfaktor	1,75	0,71
15614_s_at	At4g30270	Xyloglucan Endotransglycosylase	1,74	1,74
17426_at	At1g78080	Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne	1,71	0,94
15147_s_at	At4g00430	Transmembran-Protein	1,64	1,13

der niedrigen Konzentration 34 Sondensätze als induziert eingestuft wurden. Diese zeigten keine Redundanz und repräsentieren deshalb 34 verschiedene Gene, die im folgenden als NCdI-Gene (**N**iedrig **Cd**²⁺ **I**nduziert) bezeichnet werden sollen und in Tabelle 19 aufgeführt sind. Um einen besseren Vergleich zwischen den Experimenten beider Arten zu ermöglichen, wurde für jedes Experiment ein sogenannter Induktionskoeffizient (IK) berechnet:

$$\text{Induktionskoeffizient (IK)} = \frac{\Sigma \text{ induzierte Sondensätze}}{\Sigma \text{ P/M-Sondensätze (Behandlung)}} \times 100$$

Dieser Wert spiegelt den Anteil der als induziert eingestuften Sondensätze an der Summe aller für die Analyse dieses Experimentes herangezogenen Sondensätze wider. Vergleicht man den Induktionskoeffizienten des *A. halleri*-Experimentes (= 1,1) mit dem des *A. thaliana*-Experimentes (= 1,3), so erkennt man, daß beide Werte sehr ähnlich sind. Dies bedeutet, daß zwar die absolute Zahl der als induziert eingestuften Sondensätzen bei *A. halleri* deutlich niedriger ist, der Prozentsatz an induzierten Genen aber in beiden Arten vergleichbar ist.

Aus dem N-Cd Datensatz konnten 15 Gene herausgefiltert werden, die eine mindestens zweifache Repression zeigten. Bei den H-Cd Experimenten konnten insgesamt 107 Sondensätzen als induziert identifiziert werden, von denen 14 ebenfalls in den N-Cd Experimenten auftauchten. Dies bedeutet, daß im Gegensatz zu *A. thaliana* nur circa 41 % der unter N-Cd induzierten Gene auch bei hoher Cadmiumbelastung induziert werden. Bei *A. thaliana* konnten ca. 74 % der Gene dieses Kriterium erfüllen. Der IK des H-Cd Experimentes lag bei 4,1 und somit unter dem Wert das *A. thaliana* H-Cd Experimentes (= 5,5). Neben den induzierten Genen konnten auch 125 Sondensätze herausgefiltert werden, die im H-Cd Experiment mehr als zweifach reprimiert waren.

Tabelle 20: Klassifizierung der NCdI-Gruppe aus *A. halleri*. Die drei am stärksten unter- bzw. überrepräsentierten Kategorien sind farblich unterlegt (grün = überrepräsentiert; blau = unterrepräsentiert).

Kategorie	Prozentsatz	Anteil am Microarray
andere physiologische Prozesse	21,4 %	11,0 %
andere metabolische Prozesse	18,4 %	25,3 %
andere biologische Prozesse	11,7 %	6,0 %
Transkription	10,7 %	5,3 %
unbekannte Funktion	8,7 %	14,0 %
Transport	5,8 %	6,8 %
abiotische oder biotische Streßantwort	4,9 %	4,2 %
DNA- oder RNA- Metabolismus	4,9 %	1,9 %
Protein-Metabolismus	2,9 %	8,7 %
generelle Streßantwort	2,9 %	2,9 %
andere zelluläre Prozesse	2,9 %	3,5 %
Signaltransduktion	1,9 %	2,4 %
Entwicklung	1,0 %	2,7 %
Elektronentransport oder Energie	1,0 %	3,4 %
Zellorganisation	1,0 %	1,9 %

Parallel zu *A. thaliana* wurde auch in *A. halleri* nach Genen gesucht, die sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Cd²⁺-Konzentrationen induziert sind und darüber hinaus eine

dosisabhängige⁵ Induktion zeigen. Diese Gruppe von Genen wird im folgenden als DCdI-Gruppe (**D**osisabhängig **Cd**²⁺ **I**nduziert) bezeichnet und ist in Tabelle 19 farblich unterlegt. Ferner wurden alle NCdI-Gene in funktionelle Gruppen eingeteilt. Das Ergebnis dieser Klassifizierung ist in Tabelle 20 dargestellt.

3.3.4.4 Kupfer bei *A. halleri*

Neben der Cd²⁺-Behandlung wurden die hydroponisch kultivierten Pflanzen mit 10 µM Cu²⁺ gestreßt. Die Auswertung dieser Experimente ergab, daß 228 Sondensätzen als reprimiert eingestuft wurden wohingegen 327 als induziert gewertet wurden (siehe Anhang). Die Anzahl an induzierten Sondensätzen ist damit fast zehnmal größer als bei den N-Cd-Experimenten,

Tabelle 21: Klassifizierung der durch Cu²⁺ induzierten Gene aus *A. halleri*. Die drei Gruppen, die im Vergleich zum Anteil am Microarray am stärksten über bzw. unterrepräsentiert sind, wurden farblich hervorgehoben (grün = überrepräsentiert, blau = unterrepräsentiert).

Kategorie	Prozentsatz	Anteil am Microarray
andere metabolische Prozesse	29,8 %	25,3 %
Protein-Metabolismus	11,2 %	8,7 %
unbekannte Prozesse	10,8 %	14,0 %
Transport	9,3 %	6,8 %
abiotische oder biotische Streßantwort	7,8 %	4,2 %
andere physiologische Prozesse	7,3 %	11,0 %
generelle Streßantwort	6,1 %	2,9 %
Transkription	4,3 %	5,3 %
Entwicklung	3,3 %	2,7 %
Elektronentransport oder Energie	3,3 %	3,4 %
Signaltransduktion	2,9 %	2,4 %
andere zelluläre Prozesse	2,1 %	3,5 %
Zellorganisation und Biogenese	1,1 %	1,9 %
RNA- oder DNA- Metabolismus	0,6 %	1,9 %
andere biologische Prozesse	0,2 %	6,0 %

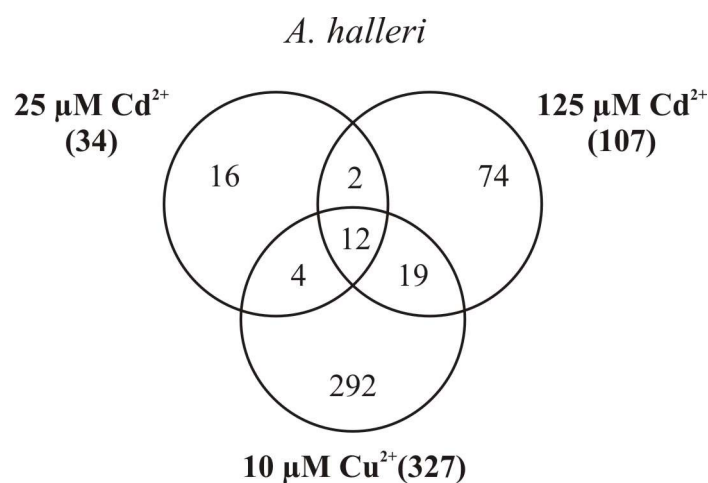


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Schnittmengen aller Experimente von *A. halleri*. Bei dieser Zusammenstellung sind jeweils die als induziert eingestuft Sondensätze miteinander verglichen worden.

⁵ Eine Induktion wurde als dosisabhängig eingestuft, wenn der Quotient der Induktionsfaktoren (hoch Cadmium/niedrig Cadmium) größer als 1 war.

was auch durch den IK-Wert von 13,6 widergespiegelt wird. Von allen ermittelten IK-Werten zeigte der Kupfer-Wert die größte Abweichung zum *A. thaliana* Pendant (= 16,2). Eine Einteilung der durch Cu^{2+} -induzierten Sondensätze in die verschiedenen Klassen ist in Tabelle 21 gezeigt. Mit fast einem Drittel stellt die Klasse „andere metabolische Prozesse“ die größte Gruppe dar, wohingegen aber die beiden Gruppen „abiotischer oder biotischer Streß“ und „generelle Streßantwort“ im Vergleich zum Anteil am Microarray am stärksten überrepräsentiert sind.

Bei einem Vergleich der einzelnen Experimente (siehe Abbildung 27) ist zu erkennen, daß die Überschneidung zwischen den Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Experimenten im Gegensatz zu *A. thaliana* relativ gering ist. Insgesamt werden nur 12 % der durch Kupfer induzierten Gene auch durch Cd^{2+} beeinflusst, wohingegen bei *A. thaliana* 40 % der induzierten Gene dieses Kriterium erfüllen. Beim Vergleich aller Experimente konnten 12 Gene (siehe Tabelle 22) identifiziert werden, die in allen Behandlungen als induziert eingestuft wurden. Das Auffälligste an dieser Zusammenstellung ist die Tatsache, daß fast die Hälfte dieser Gene für putative Transkriptionsfaktoren kodiert.

Tabelle 22: Auflistung der Gene, die bei allen drei getesteten Streßbedingungen in den Wurzeln von *A. halleri* als induziert eingestuft wurden. Putative Transkriptionsfaktoren sind durch ein Pluszeichen gekennzeichnet.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	putativer Transkriptionsfaktor
14643_s_at	At2g03760	Steroid-Sulfotransferase	
15203_s_at	At1g68840	AP2-Domain Protein	+
15431_at	At4g27280	EF-Hand Protein	
15647_s_at	At4g14680	ATP-Sulfurylase	
15665_s_at	At5g04340	C2H2 Zinkfinger-Protein	+
16536_s_at	At5g47230	ERF5	+
16539_s_at	At4g17490	ERF6	+
16620_s_at	At5g57560	TCH4	
16817_s_at	At4g11280	ACC-Synthase 6	
17381_at	At4g36500	exprimiertes Protein	
18224_s_at	At4g21830	exprimiertes Protein	
20489_at	At2g44840	EREBP	+

Tabelle 23: Auflistung von nicht-kupferresponsiven Genen der NCdI-Gruppe von *A. halleri*.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt
12614_at	At4g02790	exprimiertes Protein
12644_at	At1g67710	ARR11-ähnliches Protein
12688_at	At4g30100	exprimiertes Protein
12730_f_at	At1g35515	MYB-Transkriptionsfaktor
14895_s_at	At4g17830	putative Aminoacylase
15147_s_at	At4g00430	Transmembran-Protein
15614_s_at	At4g30270	Xyloglucan Endotransglycosylase
16611_s_at	At5g13550	Sulfat-Transporter
16924_s_at	At2g18020	ribosomales Protein
17219_s_at	At2g47680	RNA-Helikase
17426_at	At1g78080	Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne
17614_at	At4g07960	Glycosyltransferase
17620_s_at	At2g42990	GDSL-Motiv Lipase/Hydrolase
17705_i_at	At1g23680	OBP32pep-ähnliches Protein
17967_at	At3g46930	Proteinkinase
18466_at	At1g10160	reverse Transkriptase
18751_f_at	At4g38620	MYB4
20699_at	At2g45160	Scarecrow-Transkriptionsfaktor

Darüber hinaus konnten 18 Gene identifiziert werden, die in der NCdI-Gruppe enthalten sind, aber keine Kupferresponsivität zeigten (siehe Tabelle 23). Im Gegensatz zu *A. thaliana* finden sich aber in dieser Gruppe keine putativen Metalltransporter. Stattdessen ist erneut der Anteil an putativen Transkriptionsfaktoren mit fünf Kandidaten (At1g67710, At1g35515, At1g78080, At4g38620, At2g45160) relativ hoch.

3.3.4.5 Unabhängige Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mittels quantitativer realtime-PCR

Neben der statistischen Auswertung der Microarray-Daten war es nötig, die erhaltenen Ergebnisse durch unabhängige Methoden zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden Pflanzen beider Arten im hydroponischen System angezogen und identisch zu den Microarray-Experimenten mit verschiedenen Schwermetallen gestreßt. Nach Beendigung der Streßbehandlung wurden die Wurzeln geerntet und das Expressionsprofil der folgenden Gene mittels quantitativer RT-PCR untersucht: kleines Hitzeschockprotein (At1g53540), EREBP (At2g44840), ARR11-ähnliches Protein (At1g67710), BCBP (At5g20230), Rezeptorkinase (At4g28350). Die Wahl fiel auf diese Gene, da sie gewisse Besonderheiten aufwiesen. Das kleine Hitzeschockprotein (At1g53540) zeigte ausschließlich in *A. thaliana* eine starke Cadmiumresponsivität, war aber in *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert. Das Gen EREBP (At2g44840) wurde ausgewählt, da es sich hierbei um einen putativen Transkriptionsfaktor handelt, der in beiden Arten durch alle Streßbehandlungen induziert wurde und dessen Induktionswerte zum Teil stark variierten. Somit sollte geklärt werden, ob die Microarray-Analysen neben der qualitativen auch quantitative Aussagen ermöglichen (speziell im Falle von *A. halleri*). Das BCBP (At5g20230) wurde aus denselben Gründen in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei dem Gen At1g67710 (ARR11-ähnliches Protein) handelt es sich um einen Kandidaten, der in *A. halleri* durch niedrige Cd^{2+} -Konzentrationen schwach induziert wurde, aber in *A. thaliana* unter den getesteten Bedingungen keine Cadmiumresponsivität zeigte. Das Expressionsprofil der Rezeptorkinase (At4g28350) wurde analysiert, da dieses Gen in beiden Arten eine kupferspezifische Induktion zeigte.

Die Ergebnisse der realtime-PCR Versuche sind in Abbildung 28 graphisch zusammengefaßt. Für die Berechnung der relativen Transkripthäufigkeit wurden die Mittelwerte der $\Delta\Delta\text{CT}$ (siehe 2.4.12) Werte verwendet. Bei vier der fünf untersuchten Gene konnte das Expressionsprofil bestätigt werden. Einzige Ausnahme war At1g67710 (ARR11-ähnliches Protein), das in den Microarray-Experimenten in *A. halleri* ausschließlich nach der Behandlung mit $25 \mu\text{M Cd}^{2+}$ eine schwache Induktion zeigte.

Das Expressionsprofil des kleinen Hitzeschockproteins konnte unter allen getesteten Bedingungen bestätigt werden. Dieses Gen zeigt nur in *A. thaliana* eine signifikante Responsivität, welche in Bezug auf Cd^{2+} konzentrationsabhängig ist. Die Cu^{2+} -Behandlung hat ebenfalls einen Einfluß auf das Transkriptniveau und eine Quantifizierung konnte zeigen, daß die Induktionsrate, wie bei den Microarray-Auswertungen, zwischen den N-Cd und H-Cd Werten liegt. Darüber hinaus ist bei einem Vergleich der Kontrollproben zu erkennen, daß der ΔCT -Wert (siehe 2.4.12) in *A. halleri* um den Faktor 1,7 niedriger liegt, was einer ca. 3,2fach höheren Transkriptmenge entspricht. Dieser Befund stimmt ebenfalls mit den Daten der Microarray-Experimente überein, bei denen eine höhere Transkriptmenge in den Wurzeln von *A. halleri* ermittelt wurde.

Als zweites Gen wurde ein ARR11-ähnliches Protein (At1g67710), das wahrscheinlich für

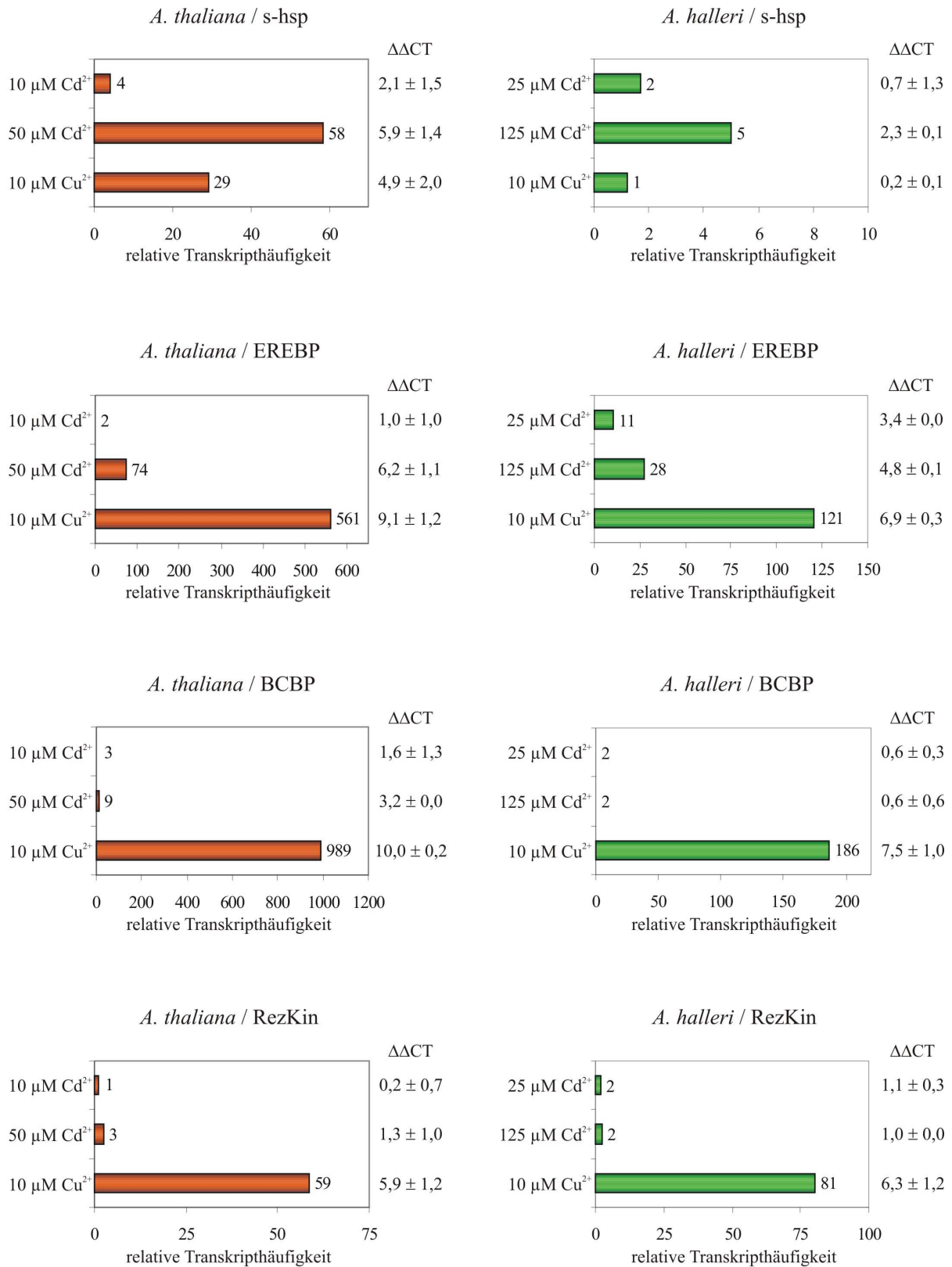


Abbildung 28: Graphische Darstellung der realtime-PCR Ergebnisse. Dargestellt sind zum einen die relative Transkripthäufigkeit bezogen auf die Kontrolleexperimente und zum anderen die $\Delta\Delta CT$ -Werte. Auf der linken Seite sind jeweils die Ergebnisse für *A. thaliana*, auf der rechten Seite die Ergebnisse für *A. halleri* gezeigt. Diese Daten repräsentieren mindestens zwei unabhängige Experimente. Von oben nach unten ist das Transkriptlevel folgender Gene abgebildet: s-hsp = kleines Hitzeschockprotein (At1g53540), EREBP = EREBP (At2g44840), BCBP = BCBP (At5g20230), RezKin = Rezeptorkinase (At4g28350).

einen Transkriptionsfaktor kodiert, auf seine Schwermetallresponsivität untersucht. Die Microarray-Untersuchungen ergaben, daß die Expression dieses Gens ausschließlich durch niedrige Cd^{2+} -Konzentrationen in *A. halleri* induziert wird. Dieses spezifische Expressionsprofil konnte jedoch durch die quantitativen realtime-PCR-Analysen nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund wurden die Resultate nicht mit in die Abbildungen und Tabellen übernommen.

Für den putativen Transkriptionsfaktor EREBP (At2g44840) konnte in *A. thaliana* eine starke Induktion (561fach) nach Kupferstreß ermittelt werden. Dieser Wert liegt deutlich über dem Ergebnis der Microarray-Analyse, aber dennoch bestätigt die realtime-Analyse das generelle Expressionsprofil (= stärkste Induktion nach Kupferbehandlung). Basierend auf der Microarray-Analyse ist das Expressionsprofil in den Wurzeln von *A. halleri* vergleichbar mit dem in *A. thaliana*. Die schwächste Induktion ist nach der N-Cd-Behandlung zu verzeichnen. Ferner kann man bei der H-Cd- Behandlung ein höheres Induktionslevel beobachten. Diese dosisabhängige Induktion konnte auch mit den realtime-PCR Experimenten bestätigt werden. Beide Auswertungen zeigen also übereinstimmend, daß durch die Kupferbehandlung die stärkste Induktion in den Wurzeln von *A. halleri* hervorgerufen wird.

Als drittes Gen wurde die Expression eines putativen Kupferchelators untersucht (BCBP = At5g20230). Dieses Gen war in den Microarray-Analysen speziell in *A. thaliana* nach der Behandlung mit Cu^{2+} dramatisch (503fach) induziert. Diese immense Induktionsrate konnte auch mittels realtime-PCR bestätigt werden. Neben der starken Induktion durch Kupfer war auch eine leichte Induktion durch die verschiedenen Cadmiumkonzentrationen zu messen. Die sowohl deutlich schwächere, als auch dosisabhängige Induktion nach Cadmiumgabe konnte durch PCR bestätigt werden. Im Gegensatz zu *A. thaliana* konnte in *A. halleri* nach der Microarray-Auswertung nur eine signifikante Induktion des Transkriptes nach Kupfergabe nachgewiesen werden. Mittels realtime-PCR konnte dieser Befund ebenfalls bestätigt werden.

Tabelle 24: Gegenüberstellung der Microarray- (= MA) und der realtime-PCR- (= realtime) Ergebnisse. Es sind jeweils die Mittelwerte aus mindestens zwei (realtime) bzw. drei (Microarray) Experimenten dargestellt. Aufgrund der Auswertungsalgorithmen können für die realtime-PCR Experimente keine Standardabweichungen angegeben werden.

Gen	Behandlung	<i>A. thaliana</i>		<i>A. halleri</i>	
		MA	realtime	MA	realtime
s-shp (At1g53540)	N-Cd	7,4 ± 3,4	4,2	1,0 ± 0,5	1,7
	H-Cd	23,1 ± 14,6	58,4	1,1 ± 0,1	5,0
	Cu	14,2 ± 7,3	29,2	1,1 ± 0,3	1,2
EREBP (At2g44840)	N-Cd	2,0 ± 1,6	2,0	27,4 ± 32,7	10,6
	H-Cd	11,5 ± 8,4	73,5	37,3 ± 14,8	27,7
	Cu	165,9 ± 75,9	561,6	87,7 ± 41,9	120,8
BCBP (At5g20230)	N-Cd	5,8 ± 5,3	2,9	1,5 ± 0,6	1,5
	H-Cd	8,1 ± 2,9	9,2	2,1 ± 1,4	1,5
	Cu	503,7 ± 111,8	989,1	29,9 ± 3,3	186,3
RezKin (At4g28350)	N-Cd	1,6 ± 0,9	1,1	1,2 ± 0,4	2,1
	H-Cd	1,9 ± 0,8	2,5	1,7 ± 1,1	2,3
	Cu	11,4 ± 3,0	58,7	12,0 ± 3,8	80,5

Als letzter Kandidat wurde das Expressionsprofil einer Rezeptorkinase (= RezKin) untersucht. Dieses Gen ist sowohl in *A. thaliana* als auch in *A. halleri* spezifisch durch Cu^{2+} induziert. Die Microarray Auswertung ergab, daß weder niedrige noch hohe Cadmiumkonzentrationen zu einer Erhöhung des Transkriptlevels in beiden Arten führte. Die Transkriptanalyse mittels PCR führte zu einem identischen Ergebnis. Im Gegensatz zu den

Microarray-Analysen konnte in *A. halleri* eine leichte Induktion (ca. zweifach) gemessen werden, diese ist jedoch im Vergleich zur Kupferbehandlung (80fach) verschwindend gering. Zusammenfassend kann man sagen, das bei vier der fünf untersuchten Gene das Expressionsprofil der Microarray-Analyse bestätigt werden konnte. In Anbetracht der Tatsache, daß für die realtime-PCR biologische Replikate verwendet wurden, können die mit Hilfe der gewählten Auswertalgorithmen generierten Datensätze der Microarrays als sehr verlässlich eingestuft werden.

3.3.4.6 Vergleich zwischen *A. thaliana* und *A. halleri*

Eine wichtige Arbeitshypothese der hier präsentierten Arbeit war die Annahme, daß sich das Expressionsmuster einer metallsensitiven (*A. thaliana*) und einer metalltoleranten Art (*A. halleri*) unter Metallstreß unterscheidet. Die Unterschiede, die bei diesem Vergleich ermittelt werden, könnten einen Hinweis darauf geben, welche Mechanismen für die höhere Toleranz bzw. Akkumulation verantwortlich sind.

Der Vergleich der verschiedenen Datensätze ergab jedoch ein unerwartetes Bild. Beim Vergleich der N-Cd Experimente konnte nur eine sehr geringe Übereinstimmung von vier SONDENSÄTZE gefunden werden. Hierbei handelt es sich um drei Zinkfinger-Proteine (At5g59820, At5g04340, At3g28210) und eine ATP-Sulfurylase (At3g28210). Zusätzlich war die ACC-Synthase 6 (At4g11280) in beiden Arten als induziert eingestuft. Aufgrund der Tatsache, daß die ACC-Synthase 6 durch verschiedene SONDENSÄTZE auf dem Microarray repräsentiert ist und bei den *A. thaliana*- und *A. halleri*-Experimenten unterschiedliche SONDENSÄTZE das Kriterium für Induktion erfüllten, konnte beim reinen Vergleich der SONDENSÄTZE diese Übereinstimmung nicht gefunden werden (vgl. Tabelle 27). Die geringe Überlappung bei den N-Cd Experimenten ist insofern verwunderlich, da beide Arten sehr nahe mit einander verwandt sind und darüber hinaus die verwendeten Cd²⁺-Konzentrationen

Tabelle 25: Übersicht über alle Gene, die zur NCdI-Gruppe von *A. halleri* gehören, deren Transkriptlevel aber in *A. thaliana* weder durch niedrige noch hohe Cd²⁺-Konzentrationen beeinflusst wurde.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt
12503_at	At2g33710	Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne
12614_at	At4g02790	exprimiertes Protein
12644_at	At1g67710	ARR11-ähnliches Protein
12688_at	At4g30100	exprimiertes Protein
12730_f_at	At1g35515	MYB-Transkriptionsfaktor
14895_s_at	At4g17830	putative Aminoacylase
15147_s_at	At4g00430	transmembranes Protein
15614_s_at	At4g30270	Xyloglucan Endotransglycosylase
16611_s_at	At5g13550	Sulfat-Transporter
16924_s_at	At2g18020	ribosomales Protein
17219_s_at	At2g47680	RNA-Helikase
17426_at	At1g78080	Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne
17614_at	At4g07960	Glycosyltransferase
17620_s_at	At2g42990	GDSL-Motiv Lipase/Hydrolase
17705_i_at	At1g23680	OBP32pep-ähnliches Protein
17967_at	At3g46930	Proteinkinase
18224_s_at	At4g21830	exprimiertes Protein
18466_at	At1g10160	reverse Transkriptase
18751_f_at	At4g38620	MYB4
20699_at	At2g45160	Scarecrow Transkriptionsfaktor

zu einer gleichen intrazellulären Cd^{2+} -Belastung führten (siehe 3.3.1). Das Phänomen der geringen Überlappung der Induktionsprofile ist auch bei den H-Cd Experimenten zu beobachten (siehe Tabelle 27). Aufgrund dieser geringen Überlappungen konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die in *A. thaliana* nicht auf Cd^{2+} reagieren aber in *A. halleri* nach der Streßbehandlung höher exprimiert werden. Diese 20 Gene sind in Tabelle 25 zusammengefaßt. Die Bedeutung dieser Gruppe liegt darin, daß sie einen Hinweis darauf geben könnte, welche Mechanismen in *A. halleri* für die höhere Cd^{2+} -Toleranz bzw. -akkumulation verantwortlich sind.

Ein weiterer Vergleich, der zur Aufklärung des Cadmium-Hyperakkumulationsphänotyps führen könnte, ist die Gegenüberstellung der NCdI-Gruppe aus *A. thaliana* mit den konstitutiv höher exprimierten Genen aus *A. halleri*. Die vier Gene, die dieses Kriterium erfüllen, sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: Auflistung der Gene, die zur NCdI-Gruppe von *A. thaliana* gehören und gleichzeitig in *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert werden.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt
12817_g_at	At1g78830	Mannose bindendes Protein
14831_at	At4g33020	ZIP9
18451_s_at	At4g33710	PR1 ähnliches Protein
18584_at	At1g10970	ZIP4

Bei der Gegenüberstellung der Kupferergebnisse zeigt sich, daß – im Gegensatz zu den Cd^{2+} -Experimenten - ein Großteil der induzierten Gene aus *A. halleri* auch in *A. thaliana* als induziert eingestuft wurde (siehe Tabelle 27). Die Klassifizierung der hochregulierten Gene führt bei beiden Arten ebenfalls zu ähnlichen Ergebnissen. In beiden Analysen umfaßt der Bereich Metabolismus mit 25-30 % numerisch die meisten Gene. Dieses Ergebnis stellt aber bei einem Vergleich mit dem Anteil am Microarray keine dramatische Überrepräsentation dar. Im Gegensatz dazu sind die beiden Bereiche „abiotische/biotische Streßantwort“ und „generelle Streßantwort“ in beiden Arten sehr stark überrepräsentiert. Generell kann man also feststellen, daß die Übereinstimmung zwischen beiden Arten bei den Kupferexperimenten wesentlich höher war, als bei den Cadmiumexperimenten (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Zusammenfassung aller Microarray-Experimente. Es ist jeweils die Zahl an SONDENSÄTZEN dargestellt, die in mindestens zwei von drei Replikaten als induziert bzw. reprimiert eingestuft wurden

Ansatz	induziert			reprimiert		
	<i>A. thaliana</i>	<i>A. halleri</i>	in beiden Arten	<i>A. thaliana</i>	<i>A. halleri</i>	in beiden Arten
N-Cd	68	34	4	27	15	0
H-Cd	257	107	20	174	125	8
Cu^{2+}	682	327	246	1239	228	154

Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit - neben der Identifikation von Hyperakkumulationsgenen – war die Aufklärung von allgemeinen Mechanismen der Metallantwort in Pflanzen. Um einen Anhaltspunkt für die zumindest ansatzweise Beantwortung dieser Fragestellung zu bekommen, wurden alle Datensätze miteinander verglichen und diejenigen Gene herausgefiltert, die sowohl durch beide Metalle als auch in beiden Arten induziert wurden. Insgesamt erfüllten fünf Gene diese Kriterien, von denen drei als putative

Transkriptionsfaktoren eingestuft werden. Die Gruppe dieser fünf Gene soll im folgenden als „Kernantwort“ bezeichnet werden und ist in Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28: Alle Gene, die zur Gruppe der Kernantwort gehören.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt
13015_s_at	At5g59820	Zinkfinger-Protein ZAT12
15647_s_at	At4g14680	ATP-Sulfurylase
15665_s_at	At5g04340	C2H2 Zinkfinger-Protein
16817_s_at	At4g11280	ACC-Synthase 6
16638_s_at	At3g28210	putatives Zinkfinger-Protein

3.3.4.7 Charakterisierung einiger Gene der Kernantwort

Nach der Identifizierung von Genen, die in beiden *Arabidopsis*-Arten nach Cd^{2+} und Cu^{2+} -Gabe induziert wurden, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob diese Kandidaten eine zentrale Rolle bei der Metallantwort spielen. Um diese Frage zu beantworten, wurden putative T-DNA-Insertionslinien für die drei Transkriptionsfaktoren (At5g59820, At5g04340, At3g28210) näher untersucht. Durch eine PCR mit Hilfe genspezifischer und T-DNA spezifischer Primer konnten im Fall der beiden Linien SALK_37357 und SALK_21881 die vorhergesagte Insertion bestätigt werden (vgl. 3.2.4). Bei der Linie SALK_40734 war dies jedoch nicht möglich. Die anschließende Sequenzierung der amplifizierten Fragmente ermöglichte es, die genaue Insertionsstelle der T-DNA zu bestimmen. Bei *AtZAT12* lag diese im Promotorbereich, 294 Basenpaare stromaufwärts des Startcodons. Beim Zinkfinger-Protein konnte die Insertion bei Base 108 des zweiten Exons lokalisiert werden (siehe Abbildung 29).

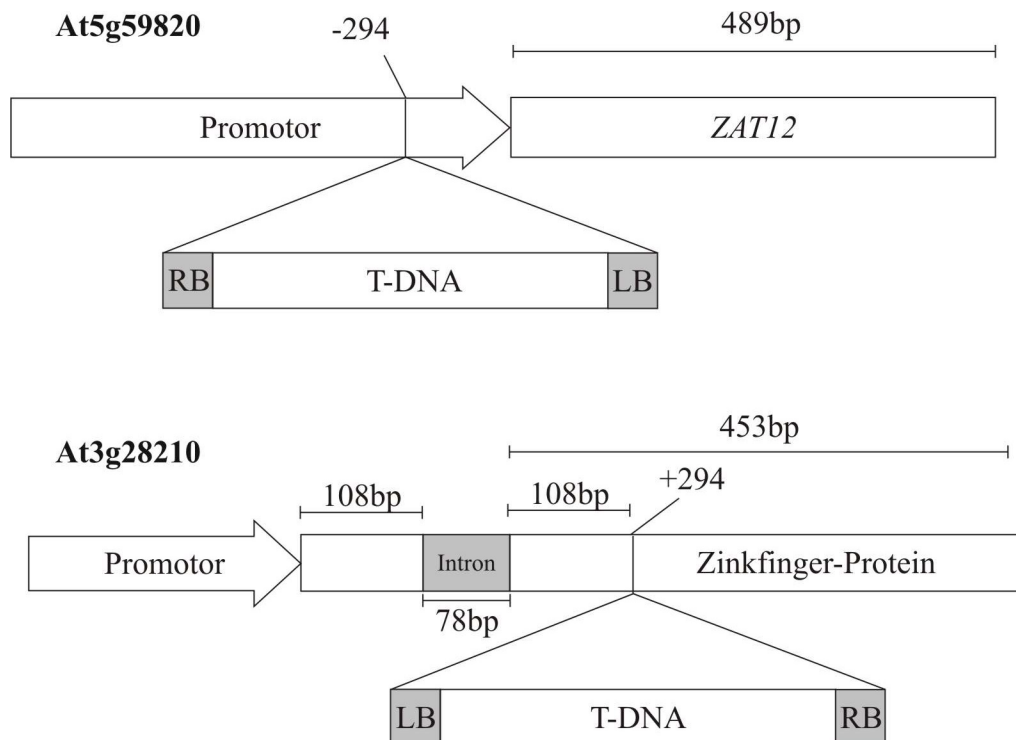


Abbildung 29: Insertionsstellen der T-DNA in den untersuchten Linien. In der oberen Hälfte ist Linie SALK_37357 (= At5g59820), in der unteren Hälfte Linie SALK_21881 (= At3g28210) dargestellt.

Im Anschluß wurden einige Pflanzen der T2-Generation auf Homozygotie bezüglich der T-DNA-Insertion untersucht (vgl. 3.2.4). Das Ergebnis der PCR-Analyse ist in Abbildung 30 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß für beide Gene homozygote Pflanzen-Linien identifiziert werden konnten. Um nun zu untersuchen, ob sich die Inaktivierung eines der beiden Gene positiv oder negativ auf die Metalltoleranz auswirkt wurden Wurzelwachstumsassay mit den homozygoten T-DNA-Insertionslinien durchgeführt. Die Auswertung dieser Versuche ergab, daß weder unter Kontrollbedingungen, noch unter Kupfer- bzw. Cadmiumstreß ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Pflanzen zu ermitteln war. Diese Beobachtung deutet daraufhin, daß der Verlust eines der beiden Gene (At5g59820, At3g28210) – unter den getesteten Bedingungen – keinen erkennbaren Einfluß auf die Metallhomöostase in *A. thaliana* hat.

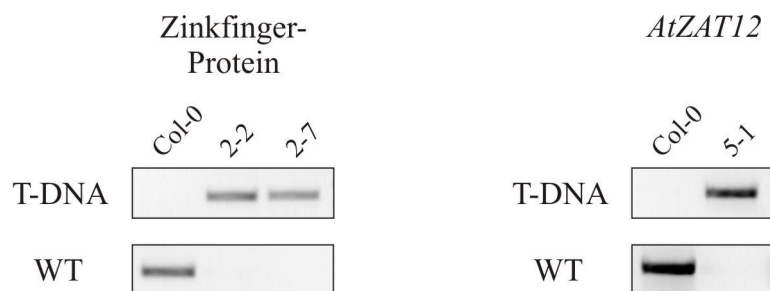


Abbildung 30: PCR-Analyse von homozygoten Knockout-Pflanzen. Auf der linken Seite ist die Analyse von Zinkfinger-Protein Knockout-Pflanzen dargestellt, auf der rechten Seite von *AtZAT12*-Knockout-Pflanzen. T-DNA = T-DNA-spezifische Primerkombination; Col-0 = Wildtyp-spezifische Primerkombination; Col-0 = Wildtyp-Pflanzen, z.B. 2-2 = Knockout-Linie.

3.3.5 2D-Gelelektrophorese

Parallel zu den cDNA-AFLP-Untersuchungen wurden 2D-Gele mit löslichen Proteinen aus Wurzeln von *A. halleri* durchgeführt. Das Ziel dieser Experimente war, zu testen, ob es möglich ist, mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese Änderungen im Proteinmuster von Pflanzen zu detektieren, die für kurze Zeit (= acht Stunden) mit Cd^{2+} behandelt wurden.

Diese spezielle Fragestellung ist insofern von zentraler Bedeutung, da der Fokus dieser Arbeit die Charakterisierung der frühen Schwermetallantwort war. Für die Analyse der Proteine wurden *A. halleri*-Pflanzen 4-5 Wochen in hydroponischer Kultur angezogen und anschließend für acht Stunden mit verschiedenen Cd^{2+} -Konzentrationen ($10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ bzw. $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$) behandelt. Diese Konzentrationen wurden gewählt, um sowohl subtoxische ($10 \mu\text{M Cd}^{2+}$) als auch toxische Bedingungen ($50 \mu\text{M Cd}^{2+}$) zu erzeugen. Da zu Beginn dieser Arbeiten die Ergebnisse der AAS-Messung bzw. Wurzelwachstumsassays (Becher, 2003) noch nicht verfügbar waren, wurden diese Konzentrationen gewählt. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Wurzeln geerntet und eine Proteinextraktion durchgeführt. Für die einzelnen Gele wurden je $150 \mu\text{g}$ Gesamtprotein verwendet. Um möglichst viele lösliche Protein auf dem Gel sichtbar zu machen wurde eine Silberfärbung verwendet. Die verschiedenen Gele sind in den Abbildung 31 bis Abbildung 33 dargestellt.

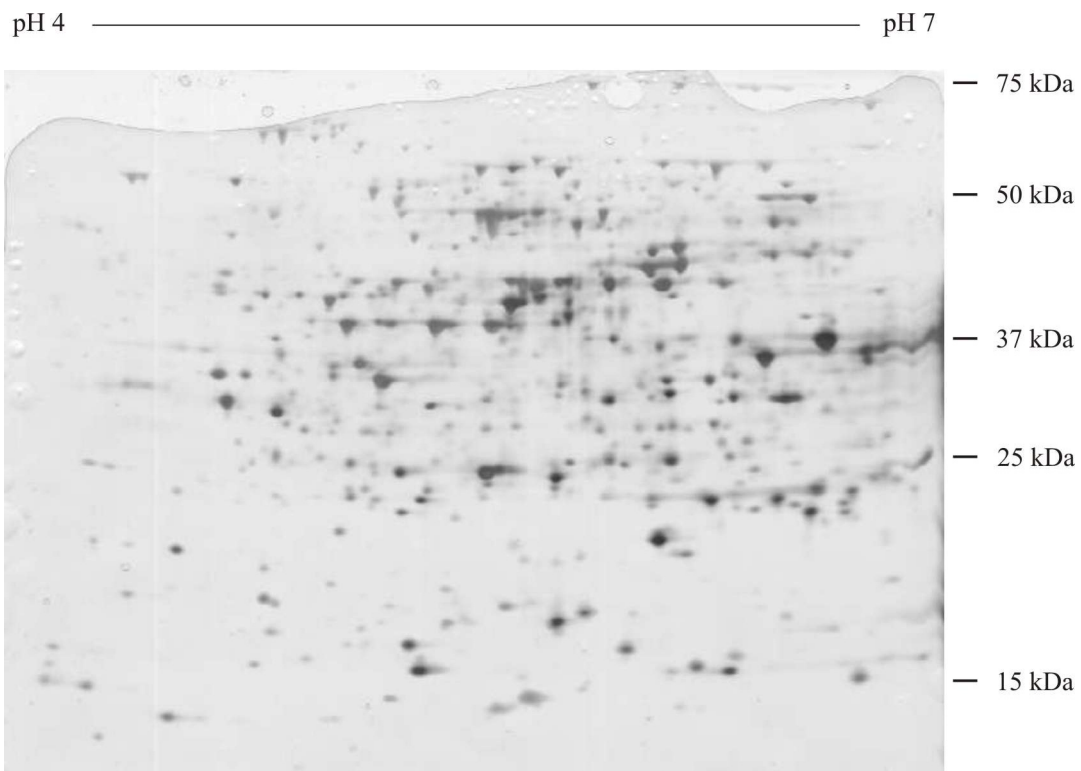


Abbildung 31: 2-D Gel von löslichen Proteinen aus den Wurzeln von Kontrollpflanzen. Es wurden pro Gel 150 μg Gesamtprotein eingesetzt, das aus drei vereinigten Pflanzen extrahiert wurde. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung.

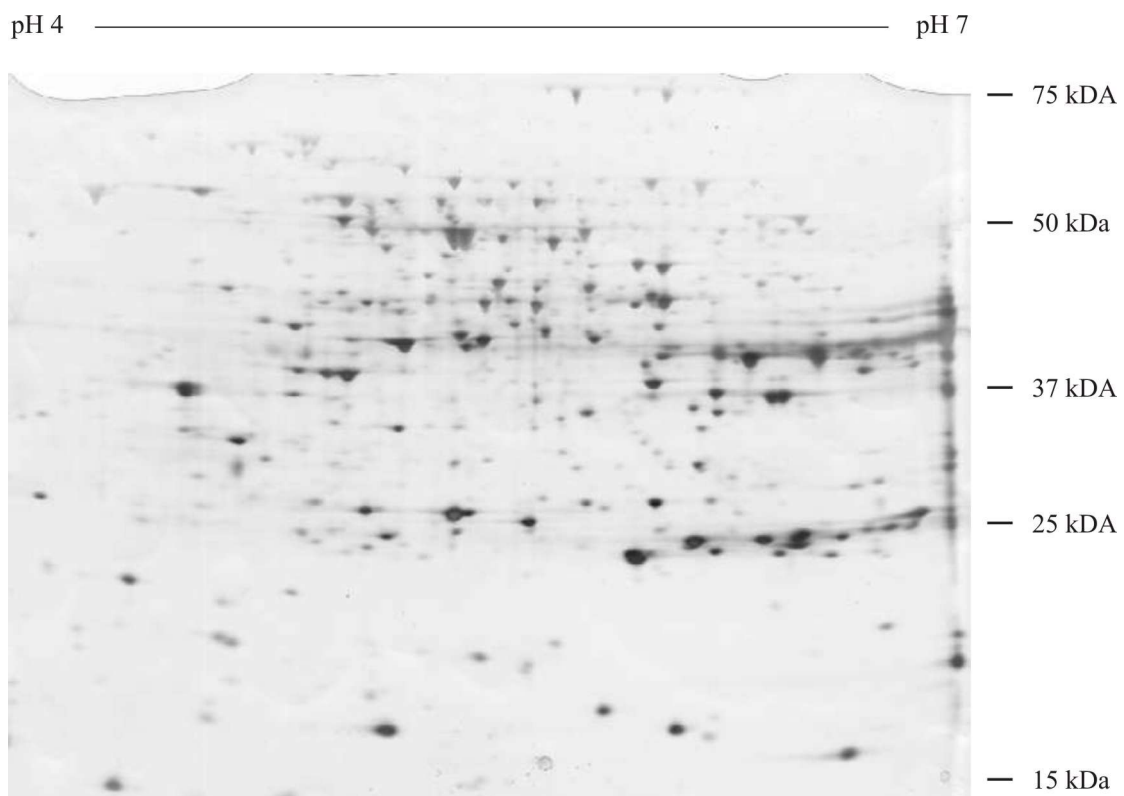


Abbildung 32: 2-D Gel von löslichen Proteinen aus getreßten *A. halleri*-Wurzeln. Die Pflanzen wurden acht Stunden lang mit 10 μM Cd^{2+} behandelt. Für eine Analyse wurden die Wurzeln von drei Pflanzen vereinigt und insgesamt 150 μg Gesamtprotein aufgetragen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung.

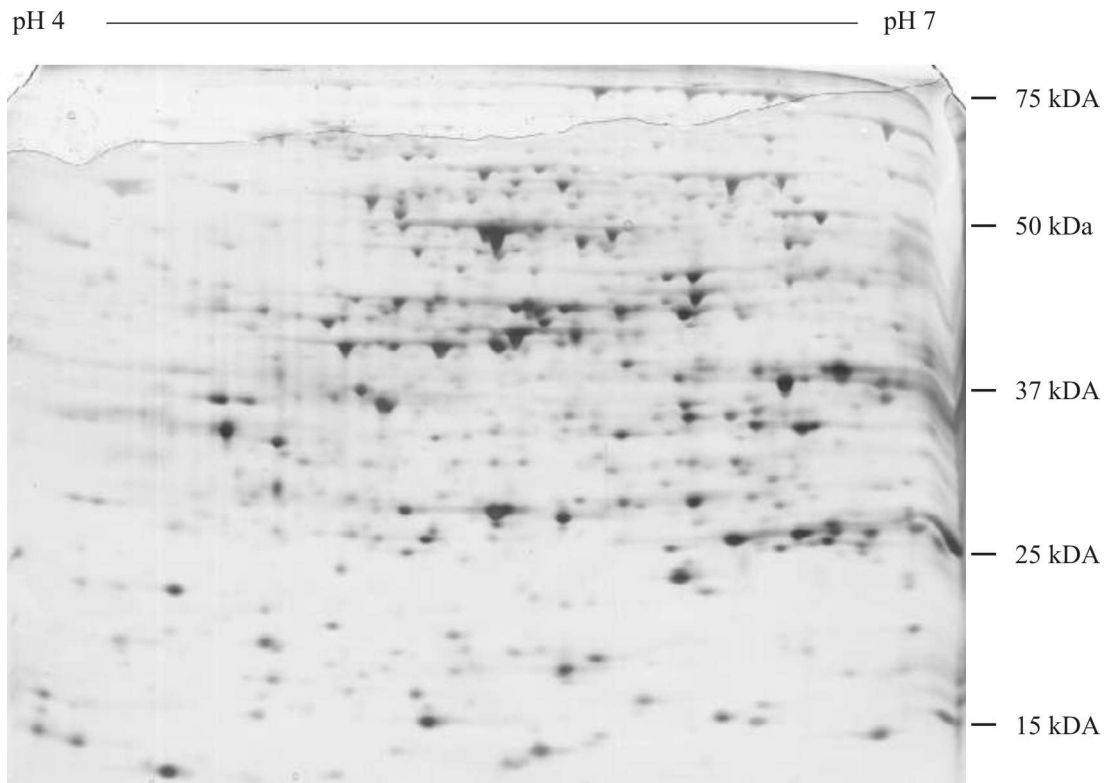


Abbildung 33: 2-D Gel von löslichen Proteinen aus den Wurzeln gestreßter *A. halleri*-Pflanzen, die für acht Stunden mit $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ behandelt wurden. Vor der Extraktion wurden die Wurzeln von drei Pflanzen vereinigt. Für eine Analyse wurden jeweils $150 \mu\text{g}$ Gesamtprotein verwendet. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung.

Die anschließende Analyse der silbergefärbten Gele ergab, daß im Mittel 330 (Kontrolle), 375 ($10 \mu\text{M Cd}^{2+}$) bzw. 376 ($50 \mu\text{M Cd}^{2+}$) Signale pro Gel detektiert werden konnten. Dieser Mittelwert beruht auf drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils biologische Replikate analysiert wurden. Die Gegenüberstellung der Gele ergab jedoch, daß nach acht Stunden keine reproduzierbaren Veränderungen im Proteinmuster zu identifizieren waren. Aufgrund der Tatsache, daß bis zum Erhalt von aussagekräftigen Ergebnissen bei 2-D Gel Analysen viele unabhängige Experimente durchgeführt werden müssen und somit eine Weiterführung dieser Experimente (größere Gele zur Erhöhung der Auflösung und Sensitivität) mit einem sehr großen zeitlichen Aufwand verbunden gewesen wäre, wurde von einer Fortsetzung dieser Experimente Abstand genommen. Ein weiterer Grund für diese Entscheidung lag darin, daß zur gleichen Zeit bereits vielversprechende Ergebnisse mittels der cDNA-AFLP-Analyse erhalten wurden, weshalb eine Fokussierung auf dieses Gebiet als sinnvoll erschien.

4 Diskussion

4.1 Konstitutiver Vergleich zwischen *A. thaliana* und *A. halleri* mittels Affymetrix-Microarrays

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von molekularen Mechanismen, die für den Metall-Hyperakkumulationsphänotyp von *A. halleri* verantwortlich sind. Hierbei war eine der grundlegenden Hypothesen, daß eine transkriptionelle Veränderung sehr häufig einen physiologischen Effekt nach sich zieht. Basierend auf dieser Annahme war geplant, die beiden Arten *A. thaliana* und *A. halleri* auf transkriptioneller Ebene zu vergleichen und Unterschiede aufzudecken. Die bei dieser Gegenüberstellung identifizierten Gene sollten einen Hinweis auf potentielle Hyperakkumulationsfaktoren geben, da sich beide Arten in ihrer Fähigkeit, Zink und Cadmium zu hyperakkumulieren, stark unterscheiden. Da es vereinzelte Hinweise in der Literatur gab, daß der Hyperakkumulationsphänotyp von *A. halleri* eine konstitutive Eigenschaft darstellt, sollten im Rahmen der Transkriptomanalysen Pflanzen beider Arten verglichen werden, die unter normalen Bedingungen (d.h. kein Schwermetallstreß) kultiviert wurden. Untersuchungen von Bert *et al.* (2000) hatten nämlich gezeigt, daß *A. halleri* sowohl auf kontaminierten, als auch auf nicht-kontaminierten Böden Zink im Sproß hyperakkumuliert. Weiterführende Experimente mit hydroponischen Kulturen ergaben außerdem, daß *A. halleri*-Ökotypen, die von unbelasteten Standorten stammten, unter Zinkstreß gleiche Mengen an Zink im Sproß akkumulieren können, wie Ökotypen aus zinkbelasteten Gebieten. Darüber hinaus konnten Macnair *et al.* (2002) durch Studien an natürlichen Populationen von *A. halleri* zeigen, daß Populationen an unbelasteten Standorten in der Lage sind, neben Zn^{2+} auch Cd^{2+} zu hyperakkumulieren.

Für die vergleichenden Transkriptomstudien sollten, aufgrund der hohen Effizienz und Reproduzierbarkeit, die speziell für *A. thaliana* entwickelten „Arabidopsis genome arrays“ (Affymetrix, Santa Clara, USA, im folgenden als „Affymetrix-Microarray“ bezeichnet) verwendet werden. Da es zu Beginn dieser Arbeiten jedoch noch keine Berichte über eine speziesübergreifende Analyse von Arabidopsisarten mit Hilfe von Affymetrix-Microarrays gab, mußte zuerst geklärt werden, ob eine Hybridisierung mit heterologen Proben zu verwertbaren Daten führt.

Im Rahmen der ersten Experimente wurden zunächst Proben von *A. halleri* analysiert und mit entsprechenden *A. thaliana*-Proben verglichen. Zur Minimierung der technisch bedingten Abweichungen und um damit eine bessere Einschätzung der Daten zu ermöglichen, wurden pro Spezies drei unabhängige Proben untersucht. Die Auswertung der Microarrays ergab, daß die Anzahl der als „present“ eingestuftten SONDENSätze für *A. thaliana* bei $60,0 \% \pm 3,7 \%$ lag und somit den in der Literatur beschriebenen Werten (60-80 %) entspricht (Zhu & Wang, 2000). Für *A. halleri* konnte mit $33,1 \% \pm 1,4 \%$ ein signifikant niedrigerer Wert ermittelt werden. Dies bedeutet, daß 55 % der „present“-Gene der homologen Hybridisierung (*A. thaliana*) auch bei der heterologen Hybridisierung (*A. halleri*) als „present“ eingestuft wurden. Diese Beobachtung war jedoch nicht unerwartet, da es aufgrund der Sequenzunterschiede bei einigen Oligonukleotid-Sonden zu keiner erfolgreichen Hybridisierung kommen kann. In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen an Rhesusaffe und Mensch, bei denen der humane Affymetrix-Microarray verwendet wurde, ergeben, daß bei der Hybridisierung der heterologen Probe (Rhesusaffe) nur 63 % der „present“-Gene der homologen Hybridisierung als „present“ eingestuft wurden (Chismar *et al.*, 2002). In Anbetracht der Tatsache, daß sich Rhesusaffe und Mensch auf genomischer Ebene um 5 % unterscheiden und der Unterschied von *A. halleri* zu *A. thaliana* auf

genomischer Ebene etwas höher ist, kann man sagen, daß die erhaltenen Werte bezüglich der Reduktion der „present“-Ereignisse vergleichbar sind.

Ein weiterer Parameter, der Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit unabhängiger Microarrays zuläßt, ist der Normalisierungsfaktor. Dieser lag bei den *A. thaliana*-Experimenten bei $9,7 \pm 4,9$ und im Fall der *A. halleri*-Experimente bei $30,5 \pm 3,5$. Diese Differenz ist vergleichbar mit Ergebnissen von Untersuchungen an verschiedenen Primatenspezies, die sich ebenfalls nur geringfügig in ihrer genomischen Sequenz unterscheiden (Enard *et al.*, 2002).

Im nächsten Schritt sollten nun diejenigen Sondensätze selektiert werden, die zum einen verlässliche Signalwerte zeigten und zum anderen für einen Vergleich zwischen beiden Arten geeignet waren. Laut Definition sollten dies Sondensätze sein, die in allen sechs Experimenten als „present“ eingestuft wurden. Insgesamt 2019 Sondensätze erfüllten diese Kriterien und wurden als Basis für die anschließende Auswertung verwendet. Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, ob die verwendeten Normalisierungs- und Auswertungs-Algorithmen - insbesondere in Bezug auf die *A. halleri*-Proben - zu validen und aussagekräftigen Resultaten führen, wurden die Daten in Form eines Scatter-Plots aufgetragen. Bei einer korrekten Normalisierung und Filterung der Daten sollte der Großteil aller „present“-Gene eine vergleichbare Signalstärke zeigen. Dies war sowohl bei der Gegenüberstellung zweier unabhängiger *A. thaliana*-, als auch bei der Gegenüberstellung zweier unabhängiger *A. halleri*-Experimente der Fall. Dies zeigte, daß die gewählten Sondensätze auch bei *A. halleri*-Experimenten sehr stabile, d.h gut reproduzierbare, Intensitätswerte lieferten. Somit kann festgestellt werden, daß durch die Fokussierung auf Sondensätze, die in allen Experimenten als „present“ eingestuft wurden, ein Datensatz generiert wurde, der verlässliche Werte beinhaltet.

Im nächsten Schritt sollte nun ein Filter abgeleitet werden, der es ermöglicht, aus dem vorhandenen Datensatz (2019 Sondensätze) potentiell interessante Kandidatengen herauszufiltern. Bei der Identifizierung von Kandidatengen wurde sich jedoch nur auf in *A. halleri* höher exprimierte Gene konzentriert, da aufgrund der technischen Gegebenheiten ein geringeres Expressionssignal bei *A. halleri* auch durch eine schlechtere Hybridisierungseffizienz bedingt sein kann. Es ist somit nicht möglich zu unterscheiden, ob eine geringere Expression eines Gens tatsächlich gegeben ist, oder ob es sich um ein technisches Artefakt handelt. Deshalb wurden für die weitere Analyse nur Sondensätze ausgewählt, die in *A. halleri* eine höhere Signalstärke zeigten, da diese Daten die größte Aussagekraft besitzen.

Aufgrund der Tatsache, daß sich der Normalisierungsfaktor direkt auf die ermittelte Signalstärke auswirkt und die *A. halleri*-Proben einen im Mittel 3,1fach höheren Normalisierungsfaktor hatten, wurde der Schwellenwert für eine „signifikant“ unterschiedliche Expression durch einen mindestens achtfachen Unterschied in der Signalstärke definiert: Dieser Wert berechnete sich aus dem allgemein verwendeten Faktor für differentiell exprimierte Gene (= 2) und dem Unterschied der Normalisierungsfaktoren, der auf ganze Zahlen aufgerundet wurde (= 4). Der Schwellenwert wurde wie oben beschrieben festgelegt, um eine sehr stringente Filterung der Daten zu erreichen und damit die Anzahl an falschpositiven Kandidaten zu minimieren. Der Scatter-Plot des „*A. thaliana* versus *A. halleri*“-Vergleichs ergab, daß bei ca. 98,0 % aller Gene die Differenz der Signalwerte innerhalb des definierten Schwellenwertes (achtfach höher oder niedriger) blieb. Dieses Ergebnis entspricht den in der Literatur aufgeführten Werten beim Vergleich unabhängiger biologischer Replikate (Zhu & Wang 2000).

Durch die beschriebene Filterung der Daten konnten insgesamt 25 Gene identifiziert werden, von denen vier in unmittelbarer Beziehung zur Metallhomöostase stehen. Hierbei handelte es sich um die Gene *NAS2* (At5g56080), *ZIP9* (At4g33020), *OAS-A2* (At3g22460) und *NRAMP3* (At2g23150), deren höhere Expression mittels unabhängiger RT-PCR zweifelsfrei bestätigt werden konnte.

In Anbetracht dieser Ergebnisse kann man sagen, daß ein Vergleich zwischen nahe verwandten Arabidopsisarten unter Verwendung von Affymetrix-Microarrays technisch möglich ist und bei der Verwendung der beschriebene Filterkriterien zu verlässlichen Resultaten führt. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß sich eine leichte Modifizierung der Filterungsbedingungen nicht negativ auf die Qualität der Daten auswirkte: Dabei wurden neben der Erniedrigung des Signaldifferenz-Schwellenwertes auch Sondensätze mit in die Auswertung einbezogen, die in *A. thaliana* als „absent“, aber in *A. halleri* als „present“ eingestuft wurden. Dieser Schritt wurde gewählt, da bei der hochstringenten Auswertung Gene ausgegrenzt werden, die ausschließlich in *A. halleri* aktiv sind und natürlich ebenfalls für den Hyperakkumulationsphänotyp verantwortlich sein können. Im Zuge der erneuten Auswertung konnten 47 zusätzliche Kandidaten identifiziert werden, von denen zwei (*ZIP4*, *HMA3*) in direktem Zusammenhang mit der Metallhomöostase stehen. Als Beweis für die Verlässlichkeit dieser Daten wurde das Expressionsprofil von *ZIP4* durch RT-PCR unabhängig bestätigt. Auf eine unabhängige Bestätigung der *AtHMA3*- bzw. *AhHMA3*-Expression wurde verzichtet, da bereits Becher *et al.* (2004) zeigen konnten, daß dieses Gen in den Wurzeln von *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert wird. Wie diese Ergebnisse verdeutlichen, führte die Abänderung der Filterungskriterien zur Identifizierung neuer Kandidaten-Gene und somit zu einem besseren Datensatz.

4.2 Identifikation potentieller Hyperakkumulationsfaktoren

Bei der näheren Betrachtung der beim konstitutiven Vergleich identifizierten Metallhomöostasegene stechen drei Gene besonders heraus: Hierbei handelt es sich um *NAS2*, *ZIP9* und *ZIP4*, die allesamt zu den am stärksten differentiell exprimierten Genen gehören. Das Gen *NAS2* zeigte mit einer fast 60fach höheren Expression sogar den höchsten gemessenen Unterschied. Neben diesen großen Expressionsunterschieden ergibt sich auch noch ein weiterer interessanter Aspekt in Bezug auf das Phänomen der Hyperakkumulation: Bei hyperakkumulierenden Pflanzen findet man im Sproß erhöhte Metallgehalte, die in manchen Fällen immense Ausmaße annehmen können. Zum Beispiel ist beschrieben, daß Pflanzen der Spezies *Thlaspi caerulescens* bis zu 3 % Zink in der Sproß-Trockenmasse akkumulieren können (Lasat *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu befindet sich bei nicht-hyperakkumulierenden Pflanzen der überwiegende Anteil der Metalle in der Wurzel und wird selbst unter Schwermetallstreß nicht in den Sproß transportiert. Die physiologische Erklärung für diesen Unterschied ist nach Chaney *et al.* (1997) darin zu sehen, daß neben der erhöhten Toleranz zwei grundsätzliche Prozesse in hyperakkumulierenden Pflanzen verändert sind. Zum einen findet sich eine erhöhte Aufnahme von Metallen in die Wurzel und zum anderen erfolgt eine wesentlich stärkere Translokation von Metallen in den Sproß (siehe Abbildung 34). Diese kann dadurch gewährleistet werden, daß die aufgenommenen Metallionen durch die Bindung an spezielle Chelatoren in einer mobilen Form gehalten werden und nicht als Präzipitat oder komplexiert in der Vakuole gespeichert werden.

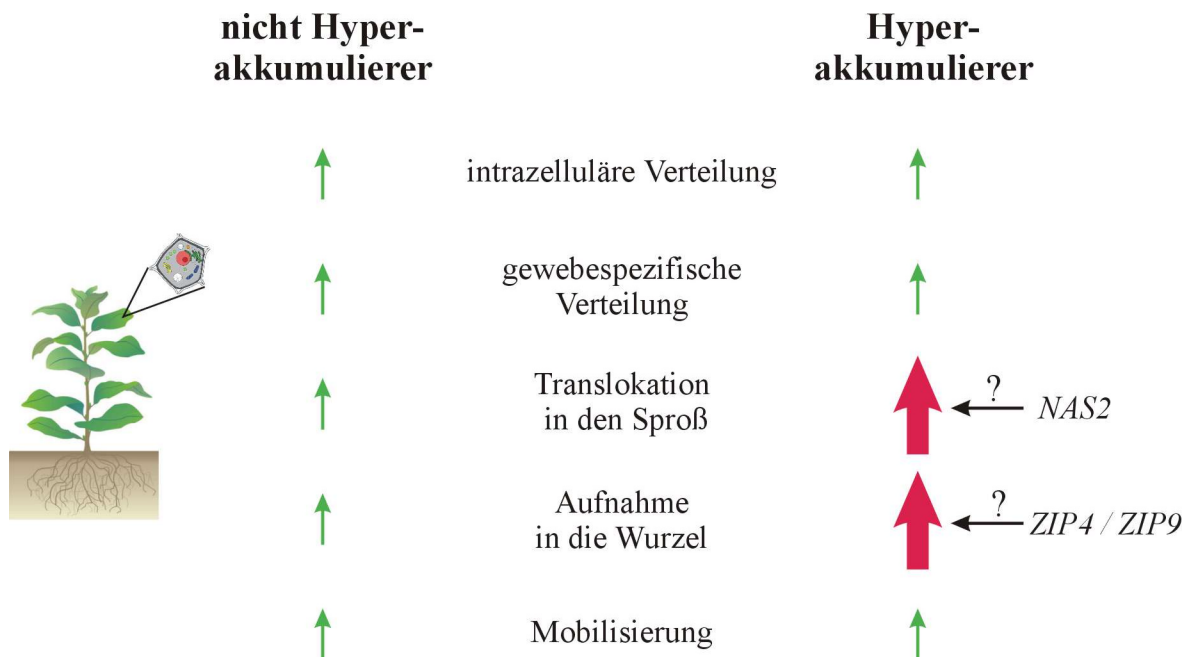


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Hyperakkumulationstheorie von Chaney *et al.* (1997). Gegenübergestellt sind nicht-hyperakkumulierende (links) und hyperakkumulierende (rechts) Pflanzen. Teilprozesse mit höherer Aktivität sind durch rote Pfeile gekennzeichnet.

Betrachtet man sich nun *NAS2*, *ZIP9* und *ZIP4* vor dem Hintergrund dieser Theorie, so ist zu erkennen, daß diese Gene in die Prozesse „Aufnahme“ und „Translokation“ involviert sein könnten und somit vielleicht eine wichtige Rolle bei der Hyperakkumulation in *A. halleri* spielen.

In *Thlaspi caerulescens*, ebenfalls ein Zink- und Cadmium-Hyperakkumulierer, konnte das homologe Gen zu *ZIP4* (*ZNT1*) identifiziert werden (Pence *et al.*, 2000). Durch Komplementationsstudien mit der *S. cerevisiae*-Mutante *zhy3* konnte festgestellt werden, daß dieser Transporter sowohl einen hochaffinen Zn^{2+} -Transport, als auch einen niedrigaffinen Cd^{2+} -Transport vermittelt. Darüber hinaus konnte durch Zinkaufnahme- und Zinkverteilungsstudien in *Thlaspi caerulescens* und *Thlaspi arvense* (Nicht-Hyperakkumulierer) festgestellt werden, daß der Hyperakkumulationsphänotyp durch eine erhöhte Aufnahme von Zn^{2+} in die Wurzel und eine verstärkte Beladung des Xylems erklärt werden kann. In der nicht-hyperakkumulierenden Spezies wurde Zink in den Vakuolen der Wurzelzellen eingelagert, was eine Translokation in den Sproß verhinderte (Lasat *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse bestätigen somit direkt die Hyperakkumulationstheorie von Chaney *et al.* (1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß wahrscheinlich die höhere Expression von *ZNT1* für die höhere Zinkaufnahme in *Thlaspi caerulescens* verantwortlich ist.

Untersuchungen an den ersten Vertretern der ZIP-Familie in *A. thaliana* (*AtZIP1-4*) ergaben, daß *ZIP4* unter normalen Bedingungen nicht in der Wurzel exprimiert wird (Grotz *et al.*, 1998), was sich auch mit den RT-PCR-Ergebnissen dieser Arbeit deckt. Aufgrund des erhöhten Transkriptlevels von *AtZIP4* unter Zinkmangelbedingungen postulierten die Autoren, daß *AtZIP4* wahrscheinlich am Transport zwischen verschiedenen Zellen oder Geweben beteiligt ist.

Ein weiterer Kandidat der ZIP-Familie, der in den Wurzeln von *A. halleri* ein konstitutiv höheres Expressionsniveau zeigt, ist *ZIP9*. Laut Computervorhersagen (www.mips.gsf.de; www.ncbi.nlm.nih.gov) handelt es sich bei diesem Protein um einen putativen Zn^{2+} -

Transporter, der über sechs Transmembrandomänen verfügt. Eine phylogenetische Analyse aller ZIP-Transporter aus *A. thaliana* ergab, daß ZIP9 die meiste Ähnlichkeit mit AtZIP4 bzw. AtIRT3 aufweist (Guerinot, 2000). Bis heute sind aber weder eine funktionelle Charakterisierung noch die Lokalisation dieses Proteins in der Literatur beschrieben, weshalb dieses Gen für weitere Untersuchungen vorgesehen wurde. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu AtZIP4 bestand die Vermutung, daß es sich bei diesem Protein ebenfalls um einen Zn^{2+} -/ Cd^{2+} -Transporter handeln könnte.

Bei dem dritten Kandidatengen handelt es sich um die Nicotianamin-Synthase 2 (*NAS2*). Das Enzym katalysiert die Bildung von Nicotianamin (NA) über die Kondensation von drei Molekülen S-Adenosyl-Methionin (vgl. 1.5.2.3). Bei Nicotianamin handelt es sich um eine nichtproteinogene Aminosäure, die in allen bis heute analysierten Pflanzen gefunden werden konnte (Pich *et al.*, 2001). NA spielt, neben der Cu^{2+} -Verteilung (Herbik *et al.*, 1999), vor allem in der Eisenhomöostase eine zentrale Rolle, wo es hauptsächlich für die Komplexierung von Fe^{2+} verantwortlich ist. Diese dient zum einen der Pufferung von cytosolischem Fe^{2+} , was die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verhindert und somit die Zelle vor oxidativem Schaden schützt (von Wirén *et al.*, 1999). Zum anderen bleiben Fe^{2+} -Ionen durch die Komplexierung mit NA löslich und können dadurch über größere Strecken innerhalb der Pflanze transportiert werden (Becker *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 2003). Die zentrale Rolle von NA in der Eisenhomöostase wird dadurch unterstrichen, daß es bei einem Mangel an NA zu Chlorosen kommt, die ein Anzeichen für Eisenmangel sind (Stephan & Scholz, 1993; Ling *et al.*, 1999). In der letzten Zeit gibt es jedoch immer mehr Hinweise in der Literatur, daß NA nicht nur in der Eisenhomöostase und Cu^{2+} -Verteilung, sondern auch beim Transport anderer zweiwertiger Ionen eine Rolle spielt (Douchkov, 2003; Takahashi *et al.*, 2003). Durch *in vitro*-Experimente konnte bereits gezeigt werden, daß NA neben Fe^{2+} und Cu^{2+} auch mit anderen zweiwertigen Ionen stabile Komplexe bilden kann (Benes *et al.*, 1983). Der Vergleich der Bindungskonstanten ergab, daß die Stabilität der Komplexe entlang der Reihe $Mn(II) < Fe(II) < Zn(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II)$ zunimmt. Erstaunlicherweise ist also die Stabilität des NA-Zn(II)-Komplexes höher, als die des NA-Fe(II)-Komplexes. Aufgrund dieser Ergebnisse war es denkbar, daß NA eine wichtige Rolle bei der Zn^{2+} -Homöostase bzw. -Hyperakkumulation in *A. halleri* spielt. Des Weiteren war es vorstellbar, daß eine höhere NA-Konzentration in den Wurzeln von *A. halleri* zur erhöhten Zn^{2+} -Toleranz beitragen könnte.

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die identifizierten Gene in der Tat eine zentrale Rolle bei der Zinkhyperakkumulation in *A. halleri* spielen, sollte das Expressionsniveau der Gene unter verschiedenen Zinkversorgungsbedingungen getestet werden. Da zu Beginn dieser Arbeiten nur die Resultate des hochstringenten Vergleiches zur Verfügung standen und die beiden Gene *NAS2* und *ZIP9*, im Gegensatz zu *AtZIP4*, in Zusammenhang mit der Zink-Homöostase noch nicht beschrieben waren, wurden nur diese beiden Gene für die anschließenden Untersuchungen ausgewählt.

Die RT-PCR-Analysen von Pflanzen, die eine Woche mit unterschiedlicher Zinkversorgung kultiviert wurden, ergab, daß die *NAS2*- und *ZIP9*-Expression in den Wurzeln von externen Zinkkonzentrationen abhängig ist. Bei Zinkübersorgung kommt es in beiden Arten zu einer Reduktion des Transkriptlevels beider Gene. Allerdings ist das Grundniveau der Expression in *A. halleri* für beide Gene deutlich erhöht. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten bezüglich der *ZNT1*-Expression im Hyperakkumulierer *Thlaspi caerulescens* und in der nicht-hyperakkumulierenden Verwandten *Thlaspi arvense* (Pence *et al.*, 2000). Hier

konnte gezeigt werden, daß *ZNT1* in *Thlaspi caerulescens* konstitutiv höher exprimiert wird, aber dennoch eine Zinkresponsivität zeigt. Dies deutet darauf hin, daß Gene, die an der Aufnahme und Verteilung von Mikronährstoffen beteiligt sind, in hyperakkumulierenden Pflanzen immer noch transkriptionell reguliert werden. Diese Regulation findet aber bei Konzentrationen statt, die um mehrere Größeneinheiten über denen in nicht-hyperakkumulierenden Pflanzen liegen. Diese Beobachtung läßt die Vermutung zu, daß in hyperakkumulierenden Pflanzen die Mechanismen zur Bestimmung der internen Metallkonzentration verändert sind. Für dieses Phänomen ist eine Reihe von Erklärungen denkbar. Zum Beispiel könnte ein regulatorisches Protein, das normalerweise nur unter Defizienzbedingungen exprimiert wird, aufgrund von Mutationen im Promotorbereich ständig abgelesen werden. Es wäre auch möglich, daß ein sensorisches Protein aufgrund eines Aminosäureaustausches eine veränderte Sensitivität aufweist.

4.3 Detaillierte Charakterisierung von *NAS2* und *ZIP9*

4.3.1 *AtZIP9* und *AhZIP9*

Nachdem die zinkabhängige Expression von *ZIP9* gezeigt werden konnte, sollte durch heterologe Expression die vorhergesagte Zinktransportaktivität bestätigt werden. Im Zuge der Klonierung der homologen Gene aus *A. thaliana* und *A. halleri* stellte sich heraus, daß die in den Datenbanken (www.mips.gsf.de, www.ncbi.nlm.nih.gov) enthaltene Sequenz von *AtZIP9* nicht korrekt ist. Die Sequenzierung der vollständigen mRNA ergab, daß die komplette Version von *AtZIP9* zusätzliche Exons am N-Terminus beinhaltet, die für insgesamt 47 Aminosäuren kodieren. Für das homologe Gen aus *A. halleri* konnte eine vergleichbare Primärstruktur ermittelt werden. Die Aminosäuresequenz von *AhZIP9* stimmt zu 94 % mit der von *AtZIP9* überein und weist zwei kleine „Lücken“ zwischen der zweiten und dritten putativen Transmembrandomäne auf. Im Gegensatz zur vorhergesagten allgemeinen Topologie von ZIP-Transportern, befindet sich die variable Region nicht zwischen der dritten und vierten (Guerinot, 2000), sondern zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne. Dieser Bereich enthält bei den meisten ZIP-Transportern eine putative Metallbindungsdomäne, die durch eine Häufung von Histidinen gekennzeichnet ist (Guerinot, 2000). Interessanterweise befindet sich bei *AhZIP9* eine der „Lücken“ in einem sehr histidinreichen Bereich, der identisch mit der Metallbindungsdomäne aus *AtIRT1* ist (Guerinot, 2000). Dieser Unterschied könnte vielleicht einen Einfluß auf die Selektivität oder Affinität des Transporters haben. Davon abgesehen konnten Arbeiten von Rogers *et al.* (2000) zeigen, daß verschiedene Aminosäuren außerhalb dieser Metallbindungsdomäne definitiv einen Einfluß auf die Selektivität von *AtIRT1* haben. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von *AtZIP9* und *AhZIP9* mit *AtIRT1* ergab, daß sich diese Aminosäuren in den homologen Proteinen nicht unterscheiden. Eine veränderte Substrat-Affinität bzw. -Selektivität ist ein interessanter Aspekt beim Vergleich der beiden homologen ZIP9-Transporter, da dadurch vielleicht der Cadmium-Hyperakkumulationsphänotyp von *A. halleri* erklärt werden könnte. Eine geringere Selektivität des *AhZIP9*-Transporters könnte z.B. zu einer erhöhten Cd^{2+} -Aufnahme oder Remobilisierung aus der Vakuole führen (je nach Art der Lokalisation), wodurch eine höhere cytosolische Cd^{2+} -Konzentration in den Wurzeln entsteht, die eine Translokation in den Sproß begünstigen würde.

Die Expression der beiden *ZIP9*-Gene in der *S. cerevisiae*-Mutante *zhy3* (Zhao & Eide, 1996b) führte zu keiner Komplementation des Zinkmangelphänotyps, weshalb eine experimentelle Bestätigung der vorhergesagten Zinktransportaktivität noch zu erbringen ist. Da bei den Komplementationsstudien die natürlichen Proteine, d.h. ohne detektierbaren Anhang, verwendet wurden, konnte nicht überprüft werden, ob es wirklich zu einer Synthese der Proteine kam. Auch über eine fehlerhafte Lokalisation innerhalb der Hefezelle, die eine richtige Funktionalität verhindern würde, kann nur spekuliert werden. Um diese Fragen zu klären, könnte man ein Fusionsprotein (*ZIP9* mit HA-tag oder GFP) verwenden und darüber hinaus andere Expressionssysteme wie *Schizosaccharomyces pombe* oder *Xenopus*-Oocyten verwenden. Durch den Einsatz unterschiedlicher Expressionssysteme könnte auch das Problem von fehlerhaften posttranslationalen Modifikationen umgangen werden. Aus zeitlichen Gründen konnten diese Untersuchungen jedoch nicht durchgeführt werden.

4.3.2 *AtNAS2* und *AhNAS2*

Als zweiter möglicher Hyperakkumulationsfaktor wurde die Nicotianamin-Synthase 2 näher untersucht. Eine Analyse der Genomsequenz ergab, daß in *A. thaliana* vier Isoformen der Nicotianamin-Synthase vorhanden sind. Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Suzuki *et al.* (1999), bei denen nur drei Isoformen postuliert wurden. Gemäß der Nomenklatur von Suzuki *et al.* wurde die neue Isoform (At1g56430) als *AtNAS4* bezeichnet. RT-PCR-Experimente und die anschließende Sequenzierung der PCR-Fragmente ergab, daß für alle Isoformen aus *A. thaliana* eine korrespondierende Isoform in *A. halleri* gefunden werden konnte. Aufgrund der Tatsache, daß die vollständige Sequenz des *A. halleri*-Genoms noch nicht verfügbar ist, kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob es noch weitere Isoformen in *A. halleri* gibt. Eine detaillierte Untersuchung des Expressionsmusters der vier Isoformen zeigte, daß in den Wurzeln von *A. halleri* die Isoformen *NAS1*, 2 und 4 detektiert werden konnten, wohingegen in *A. thaliana*-Wurzeln nur die Isoform *NAS1* nachzuweisen war. Für die Isoform *NAS3* konnte in keiner der beiden Spezies eine Expression in der Wurzel gezeigt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von Suzuki *et al.* (1999), die zeigen konnten, daß die Isoformen *AtNAS2* und *AtNAS3* nur im Sproß exprimiert werden und *AtNAS1*-Transkripte in Wurzel und Sproß nachzuweisen sind.

Betreffend der *NAS*-Expression im Sproß beider Arabidopsisarten ist anzumerken, daß sich das Muster im Vergleich zur Wurzel deutlich unterscheidet. Für die Isoform *NAS2* konnte kein Transkript nachgewiesen werden, wohingegen alle anderen drei Isoformen in *A. thaliana* höher exprimiert wurden, als im Sproß von *A. halleri*. Diese Experimente wurden daraufhin für die Isoformen *AtNAS1*, 2 und 4 auch mit Primern durchgeführt, die gegen Bereiche gerichtet waren, die in beiden Arten identisch sind. Da die Resultate übereinstimmend waren, kann ausgeschlossen werden, daß der Unterschied in der Signalstärke durch eine geringere Effektivität bei der Amplifikation der *A. halleri*-Proben verursacht wurde. Diese Behauptung wird auch durch die Arbeiten von Becher *et al.* (2004) gestützt. Hier konnte durch quantitative realtime-PCR gezeigt werden, daß die Isoformen *NAS1* und *NAS4* im Sproß von *A. halleri* schwächer exprimiert werden und die Isoform *NAS2* nicht zu detektieren ist. Lediglich bei der Isoform *NAS3* differieren die Ergebnisse, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer für *NAS3* eine geringere Effizienz bei *A. halleri*-cDNA aufweisen. Betrachtet man sich die Resultate der Expressionsanalyse im Wurzelgewebe, so ist zu erkennen, daß die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich aller vier Isoformen mit denen von Becher *et al.* (2004)

übereinstimmen. Das zentrale Ergebnis des Isoformenvergleichs ist darin zu sehen, daß für die höhere *NAS*-Expression in den Wurzeln von *A. halleri* höchstwahrscheinlich nur *NAS2* verantwortlich ist. Für die Isoform *NAS4* wurde zwar ebenfalls ein höheres Transkriptlevel in *A. halleri*-Wurzeln detektiert, aber die Anzahl der verwendete PCR-Zyklen macht deutlich, daß die Transkriptmenge im Vergleich zu *NAS2* um mehrere Größenordnungen geringer ist. Neben einer höheren *NAS2*-Transkriptakkumulation in Wurzeln von *A. halleri* konnte auch auf Protein- und Metabolitebene ein Unterschied zwischen beiden Arten ermittelt werden (Harada & von Roepenack-Lahaye, Weber *et al.*, 2004).

Daß dieses Ergebnis nicht zwangsläufig zu erwarten ist, zeigen die Untersuchungen an einem Mitglied der *OAS-TL* Familie. Im Rahmen der Microarray-Analyse konnte eine cytosolische Form der *OAS-TL* (*OAS-A2*) identifiziert werden, die in den Wurzeln von *A. halleri* elffach höher exprimiert wird, als in *A. thaliana*-Wurzeln. Für die cytosolische *OAS-TL*-Aktivität sind jedoch hauptsächlich zwei Isoformen verantwortlich (Jost *et al.*, 2000; Hell *et al.*, 2002). Mittels RT-PCR wurde festgestellt, daß für die zweite cytosolische Isoform kein Unterschied zwischen den beiden Arten nachzuweisen ist. Diese Ergebnisse decken sich auch mit Daten von Becher *et al.* (2004), die das Expressionsniveau der cytosolischen Hauptformen mittels quantitativer realtime-PCR analysierten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, daß in den Wurzeln von *A. halleri* mehr cytosolische *OAS-TL* gebildet werden müßte, was dadurch zu einer höheren Aktivität führen sollte. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Bestimmungen der Proteinmenge und der *OAS-TL*-Aktivität durchgeführt (Harada, Weber *et al.*, 2004). Diese Untersuchungen ergaben allerdings, daß sowohl auf Protein- als auch auf Aktivitätsebene keine Unterschiede festzustellen waren. Eine Erklärung hierfür wäre darin zu sehen, daß es sich, wie von Jost *et al.* (2000) postuliert, bei der Isoform *OAS-A2* um ein sogenanntes Pseudogen handelt. Dies bedeutet, daß das Gen zwar transkribiert, aber nicht funktionell translatiert wird. Somit ist deutlich, daß der Cadmiumtoleranzphänotyp von *A. halleri* nicht durch eine höhere *OAS-TL* Aktivität erklärt werden kann. Dies wurde ursprünglich vermutet, da durch die Überexpression einer *OAS-TL* in *A. thaliana* eine gesteigerte Cadmiumtoleranz erreicht werden konnte (Domínguez-Solís *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu konnte aber durch die Ergebnisse bezüglich der Nicotianamin-Synthase (größere Proteinmenge, höhere Metabolitkonzentration) die Theorie bekräftigt werden, daß NA einen möglichen Hyperakkumulationsfaktor in *A. halleri* darstellt. Die heterologe Expression von *AtNAS2* in der zinksensitiven Hefe-Mutante *Dz_{hf}* (Clemens *et al.*, 2002b) ergab darüber hinaus, daß NA auch *in vivo* mit Zink Komplexe bilden kann und somit zur Detoxifizierung dieses Schwermetalles beiträgt (Clemens, Weber *et al.*, 2004). Dies war nach unserem Wissen der erste Beweis dafür, daß Nicotianamin *in vivo* Komplexe mit Zn^{2+} bilden kann. Weiterführende Experimente mit der homologen Isoform *AhNAS2* konnten zeigen, daß es bei der Überexpression dieses Genes ebenfalls zu einer Komplementation des *Dz_{hf}*-Phänotyps kommt (Unthan, 2004). Zusammenfassend kann man also sagen, daß diese Ergebnisse einen sehr starken Hinweis darauf geben, daß Nicotianamin eine zentrale Rolle bei der Hyperakkumulation von Zink in *A. halleri* spielt und somit auch einen wichtigen Bestandteil des Zn^{2+} -Homöostase-Netzwerkes darstellt.

Diese Theorie wird auch durch die Arbeiten an transgenen Tabakpflanzen gestützt, die aufgrund einer Veränderung im Stoffwechsel einen geringeren NA-Gehalt hatten, als Wildtyp-Pflanzen. Takahashi *et al.* (2003) konnten zeigen, daß die Zinkkonzentration in den jungen Blättern der transgenen Pflanzen signifikant reduziert war. Eine externe Zugabe von NA führte bei diesen Pflanzen jedoch zu einer erhöhten Zinkkonzentration in den jungen

Blättern. Diese Resultate weisen also auch darauf hin, daß NA eine wichtige Rolle bei der Zn^{2+} -Homöostase in Pflanzen spielt.

Allerdings bleiben in diesem Zusammenhang immer noch viele Fragen offen. Zum einen ist noch völlig unklar, ob NA-Metall-Komplexe ins Xylem transportiert werden oder ob die Metalle dort auf andere Chelatoren übertragen werden. Um dies zu klären, wäre es nötig, Xylemsaft massenspektroskopisch auf das Vorhandensein von NA zu untersuchen. Zum anderen gibt es noch keine Informationen über eine mögliche gewebespezifische Expression der verschiedenen NAS-Isoformen. Eine Expression im Xylemparenchym würde z.B. auf eine spezielle Rolle bei der Xylembeladung hindeuten.

Eine dritte wichtige Frage ist, ob NA den zentralen Hyperakkumulationsfaktor darstellt, oder ob weitere Komponenten für die Ausbildung des Hyperakkumulationsphänotyps wichtig sind. Um dies zu beantworten, wäre es möglich, *NAS2* unter der Kontrolle des 35S-Promotors in *A. thaliana* zu exprimieren, um den Effekt auf die Zinktoleranz bzw. Zinkakkumulation zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Reduktion der *NAS2*-Aktivität in *A. halleri* mittels RNAi (Wesley *et al.*, 2001). Unter der Voraussetzung, daß die NA-Produktion der zentrale Mechanismus der Zinktoleranz bzw. -hyperakkumulation in *A. halleri* ist, sollten diese Pflanzen eine höhere Sensitivität zeigen und weniger Zink akkumulieren. Allerdings ist zur Zeit keine Transformationsmethode für *A. halleri* beschrieben, weshalb dieser Ansatz erst nach der Etablierung eines Transformationssystem verfolgt werden kann.

Ein anderer interessanter Ansatz wäre die gewebespezifische Reduktion der NAS-Aktivität. Dadurch könnte die Beteiligung an bestimmten Prozessen der Metallhomöostase, wie z.B. cytosolische Pufferung oder Xylembeladung, näher beleuchtet werden. In diesem Zusammenhang wäre die Erzeugung von dominant-negativen Mutationen denkbar, da es Hinweise in der Literatur gibt, daß Nicotianamin-Synthasen als Homotrimere agieren. Herbig *et al.* (1999) konnten durch Gelfiltrationsexperimente und anschließende Aktivitätsbestimmungen ermitteln, daß die aktive Form der NAS aus Gerste als Trimer agiert. Dieses Ergebnis wurde sowohl mit *NASHOR1*-überexprimierenden *E. coli*-Zellen, als auch mit einem Gerste-Wurzelextrakt erhalten. An dieser Stelle soll aber darauf hingewiesen werden, daß auch gegenteilige Ergebnisse publiziert wurden (Higuchi *et al.*, 1999). Diese Autoren untersuchten ebenfalls eine Nicotianamin-Synthase aus Gerste und konnten durch Gelfiltration und anschließende Aktivitätsbestimmung ermitteln, daß die Nicotianamin-Synthase als Monomer aktiv ist. Im Unterschied zu Herbig *et al.* wurden aber keine Rohextrakte analysiert, sondern aktive NAS-Fraktionen nach einer Hydroxylapatit-Chromatographie. Eigene Vorversuche zur Bestimmung der AtNAS2-Quartärstruktur führten ebenfalls zur Identifizierung einer monomeren Struktur (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser präliminären Experimente wurde ein Rohextrakt von *AtNAS2*-überexprimierenden Hefezellen (Weber *et al.*, 2004) mittels Gelfiltration der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Fraktionen durch eine DotBlot-Analyse auf die Bildung des Hämagglutinin-markierten Proteins hin untersucht. Da dieses Experiment nicht wiederholt und nur eine Aufschluß- und Laufbedingung getestet worden ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch die experimentelle Prozedur ein putativer trimerer Komplex zerstört wurde. Eine Wiederholung dieser Experimente unter Verwendung verschiedener Aufschluß- und Gelfiltrationsbedingungen sollte jedoch eine Beantwortung dieser Frage ermöglichen.

Ein weiteres Ziel zukünftiger Untersuchungen könnte die Identifizierung und Lokalisation von NA-Transportern sein. In Reis konnte von Koike *et al.* (2004) ein Transporter (*OsYSL2*) charakterisiert werden, der den Transport von Metall-NA-Komplexen vermittelt. Lokalisationsstudien mit einem GUS-Fusionsprotein ergaben, daß es in der Reiswurzel

spezifisch in den Geleitzellen translatiert wird, aber nicht in der Epidermis oder dem Cortex. Darüber hinaus konnte in Mais ebenfalls ein Transporter (ZmYS1) gefunden werden, der für den Transport von Metall-Phytosiderophor- bzw. Metall-NA-Komplexen verantwortlich ist (Schaaf *et al.*, 2004). Basierend auf dem Vergleich der Nukleotidsequenz, konnten in *A. thaliana* homologe Gene zu *ZmYS1* gefunden werden, die als *AtYSL1-8* (Yellow-Stripe-Like) bezeichnet werden (Schaaf *et al.*, 2004). Da es aber für keines der acht *ZmYS1*-Homologen funktionelle Daten gibt, müßten für alle Isoformen Transportstudien durchgeführt werden.

4.3.3 Molekulare Mechanismen der erhöhten *AhNAS2*-Expression

Nachdem die Hypothese bestätigt wurde, daß es sich bei NA um einen potentiellen Hyperakkumulationsfaktor handelt, sollte im folgenden näher untersucht werden, welche molekularen Mechanismen für die höhere *NAS2*-Expression verantwortlich sind. Bis heute gibt es keinen Hinweis in der Literatur, welche regulatorischen Prozesse für die höhere Aktivität bestimmter, in die Hyperakkumulation involvierter, Gene verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese verfolgt, daß es sich um ein regulatorisches Phänomen handeln müßte. Untersuchungen am Zn/Cd-Hyperakkumulierer *Thlaspi caerulescens* und der nicht-hyperakkumulierenden Verwandten *Thlaspi arvense* gaben Anlaß zu der Vermutung, daß der Unterschied in Bezug auf die Hyperakkumulation nicht auf der Existenz eines oder mehrerer zusätzlicher Gene beruht, sondern dadurch hervorgerufen wird, daß die Regulation bestimmter Gene verändert ist (Lasat *et al.*, 2000). Vergleichende Microarray-Studien an dem ebenfalls eng mit *A. thaliana* verwandten Halophyten *Thellungiella halophila* deuten auch darauf hin, daß der Unterschied in der Salztoleranz (im Vergleich zu *A. thaliana*) durch eine veränderte Regulation bestimmter Gene bewirkt wird und nicht durch die Existenz eines zusätzlichen Gens (Taji *et al.*, 2004). Es ist also denkbar, daß im Zn²⁺-Hyperakkumulierer *A. halleri* regulatorische Prozesse, die normalerweise nur bei Zinkdefizienz ablaufen, ständig aktiv sind. Ein Problem, das sich nun in diesem Zusammenhang stellt, ist die Tatsache, daß über regulatorische Mechanismen von Mikronährstoffdefizienz-Antworten in Pflanzen praktisch nichts bekannt ist. Es ist zwar beschrieben, daß die Expression verschiedener Transportergene wie *IRT1*, *FRD3* und *ZIP4* unter Defizienzbedingungen erhöht wird (Eide *et al.*, 1996; Rogers & Guerinot, 2002; Grotz *et al.*, 1998), aber welche molekularen Mechanismen für diese veränderte Transkription verantwortlich sind, ist noch nicht geklärt. Zum einen gibt es bisher keine Hinweise darauf, welche Proteine für die Detektion intrazellulärer Metallkonzentrationen verantwortlich sind. So konnten z.B. bis heute keine orthologen Proteine zu Zap1p aus *S. cerevisiae*, welches in der Hefe als Zinksensor fungiert und direkt die Expression verschiedener Gene reguliert, die an der Zinkakkumulation und -speicherung beteiligt sind, gefunden werden (Zhao & Eide, 1997; Bird *et al.*, 2003). Zum anderen konnten auch noch keine Komponenten von möglichen Signaltransduktionskaskaden identifiziert werden, die an der Metallhomöostase in Pflanzen beteiligt sind.

Aus diesen Gründen sollte die Ursache für die höhere *NAS2*-Expression in den Wurzeln von *A. halleri* untersucht werden, um Komponenten zu finden, die an der Regulation dieses Gens beteiligt sind. Eine mögliche Erklärung für die höhere Expression von *AhNAS2* – welche allerdings gegen eine veränderte Regulation sprechen würde – wäre eine Duplikation des Gens, wie sie z.B. für einen CDF-Transporter aus *A. halleri* beschrieben ist (Dräger *et al.*, 2004). Hierbei handelt es sich um das Gen *AhMTP1*, das für einen vakuolären Zinktransporter

kodiert. Dieses Gen wird, im Vergleich zu *A. thaliana* und *A. lyrata*, konstitutiv höher exprimiert. Darüber hinaus konnte in Kreuzungsexperimenten mit der zinksensitiven Pflanze *A. lyrata* gezeigt werden, daß zwei der Loci für *AhMTP1* mit der Zinktoleranz co-segregieren (Dräger *et al.*, 2004). Um also zu untersuchen, ob im Fall der *AhNAS2* ebenfalls eine Genduplikation vorliegt, wurde eine *Southern*-Blot-Analyse durchgeführt. Dieses Experiment zeigte allerdings eindeutig, daß es keine zusätzliche Kopie des Gens im Genom von *A. halleri* gibt. Somit wurde zweifelsfrei nachgewiesen, daß die höhere Expression von *AhNAS2* nicht auf einer Genduplikation beruht.

Eine weitere mögliche Erklärung, neben einer erhöhten Transkriptstabilität oder dem Vorhandensein transkriptioneller Aktivatoren, wäre eine unterschiedliche Promotor-Aktivität. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das komplette Gen aus *A. halleri*, bestehend aus Promotor, kodierender Sequenz und Terminator, in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen transformiert. Die Bestimmung der *AhNAS2*-Transkriptmenge mittels quantitativer realtime-PCR ergab, daß in fast allen transgenen Linien ein höheres mRNA-Niveau gemessen werden konnte. Hierbei handelt es sich aber lediglich um präliminäre Daten, da für die Analyse Pflanzen der T2-Generation verwendet wurden. Darüber hinaus konnte noch keine Aussage über die Insertionshäufigkeit der T-DNA gemacht werden, da diese Untersuchung erst bei der T3-Generation durchgeführt werden sollte. Dieses Experiment gibt also lediglich einen Hinweis darauf, daß der Promotor aus *A. halleri* in *A. thaliana* prinzipiell funktionell ist und vielleicht eine höhere Aktivität zeigen könnte, als der interne *AtNAS2*-Promotor. Der Sequenzvergleich beider Promotoren ergab, daß dieser Bereich nur zu 53 % identisch ist, im Gegensatz zur kodierenden Region, bei der 94 % Übereinstimmung ermittelt wurde (Vess, 2003). Eine Möglichkeit, die Theorie der unterschiedlichen Promotorstärke zu verifizieren, bestünde in der Analyse einzelner Promotorfragmente über Protoplastentransformation. Bei dieser Methode werden Promotor-GUS-Konstrukte in *A. thaliana*-Protoplasten transformiert, was zu einer transienten Expression des Reportergens führt. Über die GUS-Aktivität kann man somit auf die Promotorstärke rückschließen. Gesetzt den Fall, daß diese Untersuchungen die Vermutung einer unterschiedlichen Promotoraktivität bestätigen, dann wäre es möglich, über die Verwendung verschiedener Promotorfragmente diejenigen Abschnitte näher einzugrenzen, die für die höhere Aktivität verantwortlich sind. Am Ende dieser Untersuchung sollte schließlich die Identifizierung einzelner oder mehrerer Cis-Elemente stehen, die für die höhere Expression des Genes *AhNAS2* verantwortlich sind. Eine bereits durchgeführte Suche nach bekannten Cis-Elementen im Promotor von *AhNAS2* brachte jedoch kein verwertbares Ergebnis. Die Promotoren der Gene *AhZIP9* und *AhZIP4* wurden ebenfalls dieser Analyse unterzogen, aber auch in diesem Fall konnten keine regulatorischen Elemente identifiziert werden, die für eine konstitutiv höhere Expression dieser Gene verantwortlich sein könnten.

In Anbetracht der Tatsache, daß die Expression des Gens aus *A. halleri* in *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen nur zu einer maximal zehnfach höheren Expression des *AhNAS2*-Gens führte, ist es offensichtlich, daß noch weitere Faktoren nötig sind, um eine ca. 60fach höhere Expression zu erreichen. Zum Beispiel könnte es sein, daß die Promotorregion einen noch größeren Bereich, als die klonierten 1000 bp, umspannt und deshalb die ermittelte Transkriptmenge nur leicht erhöht ist. Ein weiterer Grund für die höhere *NAS2*-Expression könnte das Vorhandensein eines transkriptionellen Aktivators sein, der nur in *A. halleri* vorhanden ist oder dort stärker exprimiert wird. Die Identifikation eines solchen Faktors würde sich aber extrem schwierig gestalten, da zur Zeit noch keine geeignete Methode hierfür verfügbar ist.

4.4 Identifizierung und Charakterisierung schwermetallregulierter Gene

Das zweite zentrale Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von schwermetallregulierten Genen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf Komponenten potentieller Signaltransduktionskaskaden, da bis heute das Wissen über die pflanzliche Signalperzeption und Weiterleitung in Bezug auf Schwermetalle sehr begrenzt ist (Clemens *et al.*, 2002a).

4.4.1 cDNA –AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Zur Identifizierung potentieller Signaltransduktionskomponenten wurde eine cDNA-AFLP-Analyse mit Keimlingen von *A. halleri* durchgeführt. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Veränderungen des Transkriptoms nach Schwermetallstreß analysiert. Für die Behandlung der Pflanzen wurde ein Cocktail aus Cu^{2+} , Cd^{2+} und Zn^{2+} verwendet. Vergleichbar zu anderen cDNA-AFLP-Analysen (De Paepe *et al.*, 2004), zeigten nur etwa 6 % der amplifizierten Fragmente ein differentielles Expressionsmuster. Die Klassifizierung der klonierten Fragmente ergab, daß vor allem Gene, die zur abiotischen/biotischen bzw. zur generellen Streßantwort gezählt werden, überproportional häufig identifiziert wurden. Dieser Befund spricht dafür, daß die verwendeten Parameter für die Identifizierung metallregulierter Gene gut geeignet sind. Wie bereits erwähnt, lag ein besonderes Augenmerk auf Kandidaten, die an der Signalperzeption bzw. -transduktion beteiligt sind. Insgesamt konnten 19 unterschiedliche Gene identifiziert werden, die diesen Kategorien zuzuordnen sind. Für die ersten sieben wurde eine unabhängige Bestätigung mittels RT-PCR durchgeführt, die ergab, daß die Expression der Gene für ein Calmodulin-ähnliches Protein (At5g42380), ein putatives Calmodulin (At1g76650) und WRKY18 (At4g31800) in den Wurzeln von *A. thaliana* und *A. halleri* durch Cu^{2+} induziert wird. Für die restlichen zwölf wurde auf diese Analyse verzichtet, da Microarray-Experimente durchgeführt werden sollten, die ebenfalls als unabhängige Kontrolle dienen können.

Ein Vergleich mit den verschiedenen ($25 \mu\text{M Cd}^{2+}$, $125 \mu\text{M Cd}^{2+}$, $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$) *A. halleri*-Microarray-Experimenten ergab, daß sieben dieser 19, mittels cDNA-AFLP gefundenen, Kandidaten-Genen mit Hilfe dieser Methode auch detektiert werden können. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß drei der sieben Gene durch mindestens eine der Behandlungen induziert wurden. Hierbei handelt es sich um ein C_3H_4 -Typ Zinkfinger-Protein (At1g14200), ein EREBP-ähnliches Protein (At4g17490) und ein extragroßes G-Protein-ähnliches Protein (At4g34390). Der weitere Vergleich mit Microarray-Experimenten⁶ von Fritsche (2004), im Zuge derer Wurzeln von *A. thaliana* für zwei Stunden mit $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$ behandelt wurden, ergab, daß insgesamt neun der 19 Kandidaten in *A. thaliana* durch Kupfer induziert werden. Bei einem Vergleich mit anderen Arbeiten (De Paepe *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2004; Bachem *et al.*, 1996) ist zu erkennen, daß der Prozentsatz an unabhängig bestätigten Kandidaten normalerweise höher liegt. Diese Diskrepanz kann jedoch weitgehend erklärt werden: Zum einen wurden für die Experimente des cDNA-AFLPs ganze Keimlinge verwendet, da zu Beginn dieser Arbeiten noch kein hydroponisches Kultursystem für *A. halleri* bzw. *A. thaliana* zur Verfügung stand. Die RT-PCR- sowie die Microarray-Experimente zur unabhängigen Bestätigung der cDNA-AFLP-Daten wurden aber mit Wurzelmaterial durchgeführt, da im Fokus dieser Arbeit die wurzelspezifische Metallantwort lag. Aus diesen

⁶ Bei diesen Experimenten wurde der ATH1-Chip (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet, der ca. 22 000 Gene des *A. thaliana*-Genoms abdeckt.

Gründen ist es möglich, daß ein Gen, das im cDNA-AFLP identifiziert wurde, metallreguliert ist, aber aufgrund einer sproßspezifischen Expression in den RT-PCR- bzw. Microarray-Experimenten nicht als metallresponsiv eingestuft wird. Dies ließ sich z.B. für *WRKY11* zeigen, dessen Expression im Sproß beider Arten nach 24 Stunden Kupferstreß induziert wird (Daten nicht gezeigt), aber in der Wurzel keine Kupferresponsivität zeigt. Ein weiterer Grund für die geringe Bestätigungsrate ist darin zu sehen, daß für die cDNA-AFLP-Experimente wesentlich höhere Konzentrationen an Metallionen verwendet wurden, als bei den anschließenden hydroponischen Experimenten. Die Reduktion der Metallkonzentrationen sollte sicherstellen, daß die ausgelösten Effekte auf das Metallion selbst und nicht auf sekundäre Effekte wie z.B. oxidativen Streß (Schützendübel & Polle 2002) zurückzuführen sind.

Wie bereits erwähnt, konnte mittels RT-PCR für die Gene Calmodulin-ähnliches Protein (At5g42380), putatives Calmodulin (At1g76650) und *WRKY18* (At4g31800) eine Induktion durch Cu^{2+} nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die ersten beiden Gene in „detached leaves“-Experimenten schon bei Kupferkonzentrationen von $1 \mu\text{M}$ induziert wurden. In Anbetracht der Tatsache, daß die blattinterne und somit biologisch relevante Konzentration noch deutlich unter $1 \mu\text{M}$ liegt, kann man davon ausgehen, daß die Expression dieser Gene sehr empfindlich durch den Kupfergehalt in der Zelle reguliert wird. Es wäre also denkbar, daß die beiden Gene At5g42380 und At1g76650 einen Bestandteil der Signaltransduktionskaskade nach Kupferstreß darstellen.

Es ist hinlänglich bekannt, daß Ca^{2+} einen wichtigen second messenger in Tieren und Pflanzen darstellt (Snedden *et al.*, 2001), der bei einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen als Signalübermittler dient (Knight & Knight, 2001; Day *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang fand man heraus, daß durch die unterschiedliche Frequenz und Stärke der Ca^{2+} -Ströme – auch Ca^{2+} -Signatur genannt – die Information kodiert wird (Allen *et al.*, 2001), um sie auf stromabwärts gelegene Elemente zu übertragen, die ihrerseits für eine Übersetzung in geeignete zelluläre Antworten zuständig sind. Ca^{2+} -bindende Proteine, wie Calmodulin, spielen bei der Dekodierung und Übersetzung der Ca^{2+} -Signaturen eine zentrale Rolle (Snedden *et al.*, 2001; Day *et al.*, 2002).

Um nun zu klären, ob die durch cDNA-AFLP identifizierten Calmoduline eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion unter Kupferstreß spielen, wurden Knockout-Pflanzen in Wurzelwachstumsassays untersucht. Es zeigte sich in diesen Experimenten, daß der Verlust eines der beiden Gene keinen Einfluß auf das Wurzelwachstum bzw. die Keimlingsentwicklung hat. Daraus kann man schließen, daß keines der beiden Gene - unter den getesteten Bedingungen - eine Schlüsselfunktion bei der Antwort auf Kupferstreß einnimmt. Dieses Ergebnis war jedoch nicht unerwartet, da es bei Untersuchungen an Genen, die zu großen Genfamilien gehören, das Problem von überlappenden Funktionen gibt (Chen & Chen, 2002). Dies bedeutet im Umkehrschluß, daß für die Ausprägung eines veränderten Phänotyps die Funktion mehrerer Gene zerstört werden muß. Zum Beispiel ergaben Untersuchungen an den Transportern AtHMA2 und AtHMA4, daß der Verlust eines Genes zu keinem Phänotyp führt, wohingegen der Verlust beider Gene zu Zinkmangelerscheinungen führt (Hussain *et al.*, 2004).

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Ausprägung eines sichtbaren Phänotyps ist im Fall der Linie SALK_001571 (putatives Calmodulin) das Vorhandensein eines Tandemrepeats im Genom. Bei der identifizierten Knockout-Linie ist nur eine Version des Gens inaktiviert, weshalb es theoretisch möglich ist, daß die zweite Version vielleicht die Aufgabe der inaktivierten Form übernehmen kann.

Für *WRKY18* konnte in den „detached leaves“-Experimenten keine Induktion nach Cu^{2+} -Gabe ermittelt werden, was bedeutet, daß dieses Gen erst bei höheren Kupferkonzentrationen responsiv ist. Arbeiten von Chen & Chen (2002) haben darüber hinaus gezeigt, daß die Expression von *WRKY18* ebenfalls durch Pathogene und Salicylat induziert wird. Da das Hauptinteresse dieser Arbeit jedoch auf der Identifizierung metallspezifischer Signaltransduktionskaskaden lag, wurde von einer genaueren Charakterisierung dieses Gens Abstand genommen.

4.4.2 Microarray

Aufgrund der Tatsache, daß während der Erstellung dieser Arbeit Affymetrix-Microarrays verfügbar wurden, sollte die Identifizierung und Charakterisierung metallregulierter Gene – parallel zum cDNA-AFLP – ebenfalls mit dieser Methode durchgeführt werden. Da zu diesem Zeitpunkt abzusehen war, daß der proteinbiochemische Ansatz über 2-D-Gelelektrophorese zu keinem Erfolg führt, wurde entschieden, sich auf die Strategie der Transkriptomanalyse zu konzentrieren.

Ein großer Vorteil von Microarrays besteht darin, daß die Expression einer Vielzahl von Genen (in diesem Falle ca. 8100) parallel analysiert werden kann und somit sehr schnell qualitativ hochwertige Daten generiert werden können (Zhu & Wang, 2000). Ein weiterer Grund für die Durchführung dieser Experimente lag darin, daß mittlerweile ein hydroponisches Kultursystem für beide Arten etabliert werden konnte, was eine gewebespezifische Analyse ermöglichte. Hierbei wurde sich auf das Wurzelgewebe beschränkt, da Metallionen unter natürlichen Bedingungen quasi ausschließlich über dieses Gewebe aufgenommen werden. Darüber hinaus ist bekannt, daß in den meisten Pflanzen der größte Prozentsatz der Metalle in den Wurzeln lokalisiert ist. Darauf basierend kann man davon ausgehen, daß zentrale Prozesse der Metallhomöostase und Detoxifizierung vor allem in der Wurzel ablaufen. Eine alleinige Fokussierung auf den Sproß würde somit den Nachteil mit sich bringen, daß diese wurzelspezifischen Prozesse nicht in Betracht gezogen würden.

Die grundlegende Strategie der Microarray-Experimente war es, eine vergleichende Analyse der molekularen Effekte durchzuführen, die folgende Parameter umschloß:

- Vergleich zwischen essentiellen (Cu^{2+}) und nicht-essentiellen (Cd^{2+}) Metallionen
- Vergleich zwischen nicht-toxischen und toxischen Cd^{2+} -Konzentrationen
- Vergleich zwischen *A. thaliana* und *A. halleri*

Die ermittelten Unterschiede und Überschneidungen der Metallantworten von *A. thaliana* und *A. halleri* sollten speziell einen Hinweis darauf geben, ob es im Pflanzenreich konservierte regulatorische Mechanismen gibt und wenn ja, welche dies sind.

Um einen aussagekräftigen Vergleich durchführen zu können, mußten Bedingungen gefunden werden, die in beiden Arten eine vergleichbare Streßsituation verursachen. Untersuchungen von Becher (2003) hatten gezeigt, daß *A. halleri*-Pflanzen bei gleicher Cadmiumbelastung im Medium wesentlich weniger Cadmium aufnehmen, als *A. thaliana*-Pflanzen. Da das besondere Augenmerk der Microarray-Experimente auf den molekularen Mechanismen der Metallantwort lag, sollten aber Bedingungen gewählt werden, bei denen die intrazelluläre Cadmiumbelastung in etwa gleich ist. Durch Cd^{2+} -Aufnahmeexperimente und anschließender Bestimmung der intrazellulären Cadmiumkonzentration durch AAS konnte ermittelt werden, daß beide Arabidopsis-Spezies die gleiche Menge an Cd^{2+} in den Wurzeln akkumulieren, wenn sie für zwei Stunden mit 10 μM (*A. thaliana*) bzw. 25 μM Cd^{2+} (*A. halleri*) behandelt

wurden. Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Durchführung der Experimente war die Tatsache, daß die verwendeten Cadmiumkonzentrationen nicht im toxischen Bereich liegen sollten. Durch die Bestimmung der Wurzelelongation bei verschiedenen Cadmiumbelastungen konnte gezeigt werden, daß es bei *A. thaliana* nach einer viertägigen Behandlung erst bei Konzentrationen über 10 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ (unter vergleichbaren Kulturbedingungen) zu einer signifikanten Reduktion des Wurzelwachstums kam (Becher, 2003). Für *A. halleri* wurde unter gleichen Bedingungen eine Konzentration von 30 $\mu\text{M Cd}^{2+}$ ermittelt. Somit kann man davon ausgehen, daß eine zweistündige Behandlung mit den gewählten Cadmiumkonzentrationen zu keinen toxischen Effekten führt. Für die Erzeugung von toxischen Cadmiumbelastungen wurden diese Konzentrationen bei beiden Spezies verfünffacht.

Die Ergebnisse der Cadmiumaufnahmeuntersuchungen in Zusammenhang mit den Daten von Becher (2003) lassen den Rückschluß zu, daß ein Teil der höheren Cadmiumtoleranz von *A. halleri* auf einer verminderten Aufnahme von Cadmiumionen beruht. Die in der Literatur verbreitete Hypothese über die Aufnahme von Cadmium in die Pflanzen besagt, daß diese Ionen über Transporter in die Wurzel gelangen, die normalerweise andere Ionen wie Zn^{2+} und Fe^{2+} transportieren und eine geringe Substratspezifität aufweisen. Die einzige Ausnahme stellt der „Ganges“-Ökotyp von *Thlaspi caerulescens* dar, der über eine spezifische Cadmiumtransportaktivität zu verfügen scheint (Lombi *et al.*, 2001). Allerdings konnte bis heute noch nicht der dafür verantwortliche Transporter identifiziert werden. Die Fähigkeit, Cd^{2+} zu transportieren, wurde jedoch bereits bei einigen Transportern wie z.B. AtIRT1, TcZNT1, AtHMA3, AtHMA4, AtNRAMP3 experimentell nachgewiesen (Korshunova *et al.*, 1999; Pence *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2003; Gravot *et al.*, 2004; Thomine *et al.*, 2003). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse läßt sich die Vermutung aufstellen, daß die Transporter aus *A. halleri* im Vergleich zu ihren Pendanten aus *A. thaliana* eine höhere Selektivität zeigen. Ein möglicher Kandidat hierfür könnte IRT1 sein. Untersuchungen an *Thlaspi caerulescens* konnten zeigen, daß unter Eisenmangel die Expression dieses Gens gesteigert war und zugleich eine höhere Cd^{2+} -Aufnahme gemessen werden konnte (Lombi *et al.*, 2002). Aufgrund der Tatsache, daß IRT1 nur unter Eisenmangel verstärkt exprimiert wird (Eide *et al.*, 1996), ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß es noch weitere Cd^{2+} -Eintrittspforten in die Pflanze gibt. Welche Aufnahmesysteme dies konkret sein könnten, ist bis heute allerdings noch nicht bekannt.

4.4.2.1 Cadmiumstreß

4.4.2.1.1 *A. thaliana*

Die Auswertung der niedrig-Cadmium-Experimente (N-Cd) bei *A. thaliana* ergab, daß weit über 10 % der induzierten Gene kleine Hitzeschockproteine waren. Eine weitere Auffälligkeit war, daß es sich bei den vier am stärksten induzierten Genen ebenfalls um kleine Hitzeschockproteine handelte. Kleine Hitzeschockproteine sind oligomere Proteine, die ubiquitär in Pro- und Eukaryonten nach Hitzestreß gebildet werden (Sun *et al.*, 2002). Sie binden ungefaltete Proteine und schützen sie somit vor irreversibler Aggregation (Friedrich *et al.*, 2004). Es ist bekannt, daß Hitzeschockproteine nicht nur in Folge von zu hoher Temperatur, sondern auch bei Schwermetallstreß gebildet werden (Buckley *et al.*, 2004; Hall, 2002). Aufgrund der hohen Anzahl an induzierten Hitzeschockproteinen ist anzunehmen, daß eine wesentliche Komponente der Streßantwort auf Cadmiumbelastung darin besteht, eine Mißfaltung und Aggregation von Proteinen zu verhindern. Sieht man diese molekulare Antwort nun in Zusammenhang mit den postulierten Toxizitätsmechanismen von

Cadmium (vgl. 1.2), so ist anzunehmen, daß die Denaturierung von Proteinen durch die Bindung bevorzugt an Schwefel-Seitengruppen wahrscheinlich ein sehr gravierendes Problem für die Pflanze darstellt.

Neben den Hitzeschockproteinen finden sich auch einige Gene, die bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle spielen. Dazu zählen einige Peroxidasen, eine GSH-S-Transferase und der H₂O₂-Marker ZAT12 (Rizhsky *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da in der Literatur diskutiert wird, daß ein Mechanismus der Cadmiumtoxizität die Generierung von ROS darstellt (Stoys & Bagchi, 1995). Der relativ geringe Anteil an ROS-responsiven Genen deutet aber darauf hin, daß die Bildung von ROS – zumindest bei moderater Cadmiumbelastung – nicht den Haupttoxizitätsmechanismus darstellt.

Ferner fällt bei der Betrachtung der NCdI-Gruppe auf, daß die Transkription zweier zentraler Enzyme des Schwefelstoffwechsels induziert wurde. Hierbei handelt es sich um die Serin-Acetyl-Transferase (At1g55920), die eine Rolle bei der Cysteinbiosynthese spielt, und eine ATP-Sulfurylase (At4g14680), welche den ersten Schritt der Schwefelassimilation in Pflanzen katalysiert. Die höhere Expression einer ATP-Sulfurylase nach Cadmiumstreß steht im Einklang mit den Untersuchungen an *Brassica juncea*, bei der ebenfalls eine stark erhöhte Expression dieses Gens in den Wurzeln von sechs Wochen alten Keimlingen beobachtet wurde, wenn diese mit 25 µM Cd²⁺ gestreßt wurden (Heiss *et al.*, 1999).

Die Serin-Acetyl-Transferase (SAT) katalysiert in Verbindung mit der O-Acetylserin-(thiol)-Lyase den letzten Schritt der Cysteinbiosynthese (Hell *et al.*, 2002), wobei die Komplexbildung sogar essentiell für eine hohe Aktivität der SAT ist (Wirtz *et al.*, 2001).

Die höhere Expression der SAT und ATP-Sulfurylase deuten darauf hin, daß es unter den getesteten Bedingungen zu einer erhöhten Produktion von Cystein kommt. Die Cysteinsynthese stellt ihrerseits wiederum den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Glutathionbiosynthese dar (Youssefian *et al.*, 2001). Glutathion spielt eine Schlüsselrolle beim Schutz der Pflanze vor verschiedenen Stressoren, wie oxidativer Streß, Xenobiotika und einige Schwermetalle (Xiang & Oliver, 1998). Darüber hinaus ist es der zentrale Baustein von PCs, die in Pflanzen und anscheinend auch in Tieren sehr wichtig bei der Detoxifizierung von Cd²⁺ sind (Howden *et al.*, 1995; Clemens, *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Arbeiten von Xiang & Oliver (1998) konnte aber keine Induktion von GSH-synthetisierenden Enzymen beobachtet werden. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, daß die Regulation dieser Enzyme nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch posttranslational erfolgt. Zum anderen wurden bei Xiang & Oliver (1998) junge Keimlinge anstatt von hydroponischen Kulturen verwendet und deutlich höhere Cd²⁺-Konzentrationen eingesetzt.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Cadmium-Versuche in *A. thaliana* ist die Induktion der Expression von zwei ZIP-Transportern. Hierbei handelt es sich um die beiden Gene ZIP4 (At2g10970) und ZIP9 (At4g33020). Für ZIP9 konnte sowohl unter niedrigen, als auch unter hohen Cadmiumkonzentrationen, eine erhöhte Expression ermittelt werden, die darüber hinaus auch dosisabhängig war. Laut Computervorhersagen handelt es sich bei beiden Transportern um putative Zn²⁺- und Cd²⁺-Transporter (vgl. 4.2 und 4.3.1). Allerdings gibt es bis heute weder einen experimentellen Beweis für diese Transportaktivitäten, noch wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. Aus diesen Gründen kann viel über die tatsächliche Rolle dieser beiden Transporter *in vivo* spekuliert werden.

Es ist theoretisch denkbar, daß es sich bei diesen beiden Transportern um vakuoläre Cd²⁺-Transporter zur Entgiftung dieses Schwermetalls handelt, da sie mit steigender

Cadmiumkonzentration ein höheres Transkriptniveau zeigen. Da für ZIP9 bis heute noch keine Funktion ermittelt werden konnte, wäre er ein möglicher Kandidat für eine solche Transportaktivität. Anders stellt sich jedoch die Situation für ZIP4 dar. Dieser Transporter wird unter Zinkmangel verstärkt exprimiert (Grotz *et al.*, 1998), weshalb seine Hauptaufgabe wahrscheinlich eher der Transport von Zn^{2+} ist.

Eine alternative Hypothese ist, daß es sich bei beiden Transportern um Zinktransporter handelt, wie es bereits für ZIP4 postuliert wurde (Grotz *et al.*, 1998). Die höhere Expression der beiden Gene kann vor diesem Hintergrund wie folgt erklärt werden: Durch den erhöhten Cd^{2+} -Einstrom entsteht in der Zelle ein funktioneller Zinkmangel, da Zn^{2+} durch Cd^{2+} aus den aktiven Zentren verschiedener Enzyme verdrängt wird, wodurch sie inaktiv werden (Stohs *et al.*, 2000). Dieser Verlust an funktionellen Zinkenzymen signalisiert der Zelle einen vermeintlichen Zinkmangel. Eine weitere denkbare Variante wäre, daß die Cadmiumionen bevorzugt an einen (vielleicht vorhandenen) Zinksensor binden und ihn damit für Zn^{2+} blockieren, wodurch der Zelle ebenfalls ein Zinkmangel signalisiert würde. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang ein Ortholog zu Zap1p aus *S. cerevisiae* (Zhao & Eide, 1997, siehe 1.6). Der durch die Bindung der Cadmiumionen an Zinkenzyme bzw. -sensoren fälschlich detektierte Zinkmangel führt dann zu einer gesteigerten Mobilisierung von Zn^{2+} aus den Vakuolen oder zu einer gesteigerten Aufnahme aus dem Boden. Für diese Mobilisierung bzw. Aufnahme könnten die beiden Transporter ZIP4 und ZIP9 verantwortlich sein (siehe Abbildung 35), da aus der Familie der ZIP-Transporter sowohl plasmamembran- als auch tonoplastenständige Vertreter bekannt sind. Ein weiterer Punkt, der diese Hypothese stützt, kommt vom konstitutiven Vergleich der beiden Arten *A. halleri* und *A. thaliana*. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, daß die beiden Transporter ZIP4 und ZIP9 in den Wurzeln von *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert werden. Es wäre also denkbar, daß diese beiden Gene für eine verstärkte Mobilisierung von Zn^{2+} aus den Wurzelvakuolen verantwortlich sind. Dadurch würde eine gesteigerte Translokation in den Sproß begünstigt werden, die charakteristisch für hyperakkumulierende Pflanzen ist (Chaney *et al.*, 1997). Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu überprüfen, wäre eine genaue Lokalisierung der beiden Proteine *in vivo*, z.B. über GFP-Fusionsproteine und konfokale Lasermikroskopie. Darüber hinaus könnte man Knockout-Pflanzen auf eine veränderte Zinksensitivität hin untersuchen. Sollte es sich aber bewahrheiten, daß beide Transporter in der Vakuolenmembran lokalisiert sind, so wäre es wahrscheinlich nötig, eine Doppel-Knockout-Mutante zu generieren, um einen sichtbaren Phänotyp zu erhalten.

Neben der im Ergebnisteil geschilderten Auswertung (A1), wurde auch eine alternative Auswertung (A2) durchgeführt, die vor allem auf die Reproduzierbarkeit der Daten abzielte (Daten nicht gezeigt). Als Filter wurde definiert, daß ein Datensatz in zwei von drei Behandlungen als „present“ oder „marginal“ eingestuft sein mußte und der Mittelwert der Induktion minus der Standardabweichung größer 1,5 sein mußte. Insgesamt 27 Datensätze passierten diesen Filter, von denen ein Großteil ebenfalls in der A1 als induziert eingestuft wurde. Der Nachteil der alternativen Auswertung (A2) war jedoch, daß die Datensätze mit den größten Induktionsfaktoren aufgrund einer großen Standardabweichung nicht mit beinhaltet waren. Der Vorteil dieser Methode (A2) liegt darin, daß Datensätze herausgefiltert werden, deren Induktionswert sehr stabil ist (d.h. sehr geringe Standardabweichung), aber etwas unter dem Schwellenwert von zwei liegt. Diese Gene können sehr wohl von Bedeutung sein, zumal wenn es sich um Transkriptionsfaktoren handelt. Es konnten mit dieser

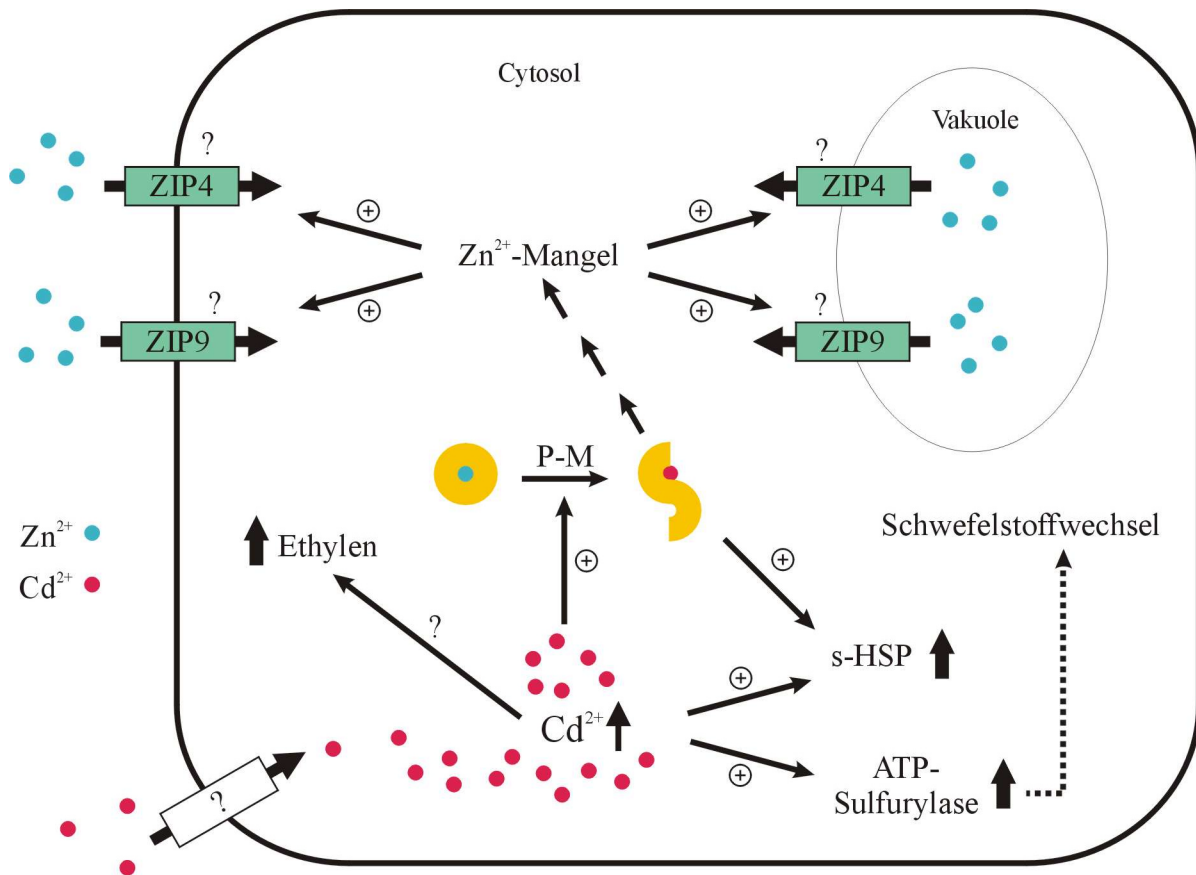


Abbildung 35: Modell der wichtigsten physiologischen Prozesse in den Wurzeln von *A. thaliana* nach Cadmiumstress. Durch die erhöhte cytosolische Cd²⁺-Konzentration werden verschiedene Prozesse beeinflusst. Es kommt zur gesteigerten Produktion von kleinen Hitzeschockproteinen (s-HSP) und zu einer höheren Expression der ATP-Sulfurylase. Ferner kommt es durch die Bindung von Cd²⁺ an Seitengruppen oder durch die Verdrängung von Zn²⁺ aus aktiven Zentren zur Mißfaltung von Proteinen (P-M = Protein-Mißfaltung). Über den so entstehenden Mangel an funktionellen Zinkenzymen wird der Zelle ein vermeintlicher Zinkmangel signalisiert, weshalb es zur gesteigerten Aufnahme bzw. Mobilisierung von Zn²⁺ kommt. Ein weiterer Effekt von erhöhten Cd²⁺-Konzentrationen könnte die Bildung von Ethylen sein.

alternativen Auswertung (A2) vier zusätzliche Transkriptionsfaktoren und zwei zusätzliche Protein-Kinasen herausgefiltert werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß für eine umfassende Analyse von Microarray-Datensätzen meistens mehrere Auswertelgorithmen verwendet werden müßten. Da jedoch eine parallele Auswertung aller Datensätze mit beiden Algorithmen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wurde sich auf die erste Auswertung (A1) beschränkt.

Bei der Analyse der H-Cd Experimente waren vor allem diejenigen SONDENSÄTZE interessant, die in Bezug auf die N-Cd Experimente eine dosisabhängige Induktion zeigten. Bei einer vergleichenden Gegenüberstellung der Experimente konnten insgesamt 41 SONDENSÄTZE identifiziert werden, die dieses Kriterium erfüllten. Unter diesen befinden sich sieben Hitzeschockproteine, von denen vier die höchste Induktion aller bei H-Cd induzierten Gene aufwiesen. Dieses Ergebnis stützt ebenfalls die Hypothese, daß neben der Bildung von PCs (Clemens *et al.*, 1999; Cobbet, 2000) die Synthese von Hitzeschockproteinen in *A. thaliana* einen zentralen Abwehrmechanismus gegen Cd²⁺ darstellt. Es konnte, wie bereits erwähnt, z.B. für Reis (*Oryza sativa*) gezeigt werden, daß kleine Hitzeschockproteine nicht nur nach Temperatur-, sondern auch nach Schwermetallstress vermehrt transkribiert werden (Tseng *et al.*, 1993). Als Bestätigung dieser Hypothese für Arabidopsisarten wäre es allerdings nötig,

eine vermehrte Produktion von Hitzeschockproteinen nach Cadmiumstreß durch *Western-Blot* nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen mit einem RNAi Konstrukt, das gegen kleine Hitzeschockproteine gerichtet ist. Eine Analyse von Knockout-Pflanzen würde sich in diesem Fall nicht anbieten, da pro Pflanze immer nur ein Gen inaktiviert ist. Da aber die Expression einer Reihe von kleinen Hitzeschockproteinen nach Cd^{2+} -Gabe induziert wurde, ist aufgrund der Redundanz bei Knockout-Pflanzen mit keinem phänotypischen Effekt zu rechnen. Im Gegensatz dazu würde die RNAi-Strategie den Vorteil bieten, daß mit einem Konstrukt eine Gruppe von Gene beeinflusst werden kann (Lawrence & Pikaard, 2003).

Eine weitere auffällige Gruppe der 41 dosisabhängig induzierten Gene stellen die Transkriptionsfaktoren dar. Summa summarum konnten acht verschiedene putative Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, von denen drei bereits in der Literatur beschrieben sind. Zwei dieser drei Gene – *AtERF1* (At3g23240) und *AtERF2* (At5g47220) – sind als „Ethylene response factor“ klassifiziert und stehen deshalb in Verbindung mit dem Phytohormon Ethylen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß *AtERF1* die Resistenz gegenüber verschiedenen Pilzen (*Botrytis*, *Plectosphaerella*, *Fusarium*) reguliert. Dies wurde dadurch bestätigt, daß eine Überexpression von *AtERF1* zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber diesen Pathogenen führte (Berrocal-Lobo & Kolina, 2004). *AtERF2* wurde als ein Transkriptionsfaktor beschrieben, der responsiv gegenüber Jasmonat und Pathogenen ist (Brown *et al.*, 2003). Der dritte beschriebene Transkriptionsfaktor ist *ZAT12*. Untersuchungen von Rizhsky *et al.* (2004) ergaben, daß er in *A. thaliana* eine wichtige Rolle bei der Antwort auf oxidativen Streß spielt. Als Komponente einer Signaltransduktionskaskade reguliert er die Expression von *ZAT7*, *WRKY25* und der cytosolischen Ascorbat-Peroxidase *Apx1*. Fünf der acht identifizierten Transkriptionsfaktoren sind noch nicht in der Literatur beschrieben. Es besteht damit die Möglichkeit, daß sie Teil einer metallspezifischen Signaltransduktionskaskade sind. Diese Gruppe beinhaltet zwei Zinkfinger-Proteine und je einen MYB-, WRKY- und einen ethylenresponsiven Transkriptionsfaktor. Um die Hypothese der Involvierung in eine metallspezifische Signaltransduktion zu untermauern, müßten Knockout-Pflanzen auf eine veränderte Metalltoleranz hin untersucht werden. Eine Alternative würde auch die Überexpression der einzelnen Gene darstellen, um auf diesem Weg eine veränderte Metalltoleranz zu bewirken.

In Anbetracht der Tatsache, daß unter den 41 dosisabhängig induzierten Genen drei ethylenresponsive Transkriptionsfaktoren und die ACC-Synthase 6, die den ersten Schritt der Ethylenbiosynthese katalysiert, zu finden sind, liegt die Vermutung nahe, daß auch Ethylen an der Signalweiterleitung nach Cadmiumstreß beteiligt sein könnte. Es gibt zumindest verschiedene Hinweise in der Literatur, die belegen, daß die Ethylenbiosynthese durch abiotische Streßbelastungen verändert wird (Munne-Bosch *et al.*, 2004; Li & Xiong 2004; Zhao & Schaller, 2004). Um diese Vermutung zu bekräftigen, wäre es z. B. denkbar, Ethyleninsensitive Mutanten auf eine veränderte Metalltoleranz hin zu untersuchen.

Ein weiteres Phytohormon, das in Zusammenhang mit Cadmiumstreß genannt wird, ist Jasmonat. Da einige Komponenten des GSH-Stoffwechsels auch durch Jasmonat induziert werden, wird in der Literatur diskutiert, ob es vielleicht in die Signaltransduktion auf Cadmiumstreß involviert sein könnte (Xiang & Oliver 1998). Allerdings konnten die in dieser Arbeit erhaltenen Daten dies nicht bestätigen und deuten eher – wie bereits erwähnt – auf eine Beteiligung von Ethylen hin.

4.4.2.1.2 *A. halleri* und Vergleich beider Arten

Die Auswertung der *A. halleri*-Experimente ergab, daß unter moderater Cadmiumbelastung (N-Cd) 34 Sondensätze als induziert eingestuft wurden. Somit lag die Anzahl deutlich unter den Werten der *A. thaliana*-Experimente. Zum Teil kann dieses Ergebnis dadurch erklärt werden, daß nur eine begrenzte Anzahl an Sondensätzen des Affymetrix-Microarrays für die spätere Auswertung verwendet werden kann. Untersuchungen von Becher (2003) ergaben zum Beispiel, daß nur 55 % aller Sondensätze für eine quantitative Analyse verwendet werden können, wenn die Microarrays mit *A. halleri*-Proben hybridisiert werden. Dieser Wert wurde durch eine Hybridisierung der Microarrays mit markierter genomischer DNA experimentell ermittelt. Im Gegensatz zu den *A. thaliana*-Datensätzen befindet sich aber kein Hitzeschockprotein unter den 34 Kandidaten, obwohl fast alle diese Gene von den verwendbaren Sondensätzen abgedeckt werden. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, daß mehr als ein Drittel aller induzierten Gene in *A. halleri* Transkriptionsfaktoren sind. Je drei dieser Gene gehören zur Gruppe der ethylenresponsiven- und AP2-Domäne-Transkriptionsfaktoren sowie zur Klasse der Zinkfinger-Proteine. Die einzigen bis heute in der Literatur beschriebenen Vertreter dieser Transkriptionsfaktoren sind die Gene *AtMYB4* (Jin *et al.*, 2000) und *AtZAT12* (Rizhsky *et al.*, 2004), welches auch bei den *A. thaliana*-Experimenten als induziert eingestuft wurde. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Induktion der ACC-Synthase 6. Dies würde wiederum – in Zusammenhang mit den drei ethylenresponsiven Transkriptionsfaktoren – dafür sprechen, daß Ethylen in die Signaltransduktion nach Cadmiumstreß involviert ist (vgl. Abbildung 35). Trotz dieser Übereinstimmungen ist aber der Anteil an Genen, die in beiden Arten nach Cadmiumgabe induziert werden, relativ gering. Neben der ACC-Synthase 6 (*At4g11280*) und *ZAT12* (*At5g59820*) konnten noch die drei folgenden Gene identifiziert werden: Zinkfinger-Protein (*At3g28210*), C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor (*At4g14680*) und ATP-Sulfurylase (*At4g14680*)⁷. Aufgrund der Tatsache, daß beide Arten sehr nahe verwandt (Koch *et al.*, 1999) und auf der Ebene der kodierenden Sequenz 94 % identisch sind (Vess, 2003), ging man von der Annahme aus, daß auch das Expressionsmuster nach Cadmiumstreß sehr ähnlich ist. Die geringe Überschneidung von 14 % (in Bezug auf *A. halleri*) entsprach somit nicht der Hypothese, deckte sich aber mit Ergebnissen von Becher *et al.* (2004) und Taji *et al.* (2004). Becher *et al.* (2004) konnten beim Vergleich von zinkinduzierten Genen in *A. thaliana* und *A. halleri* ebenfalls nur eine Überschneidung von ca. 10 % ermitteln. In den Arbeiten von Taji *et al.* (2004) wurde *A. thaliana* mit dem Halophyten *Thellungiella halophila* verglichen. Diese Pflanze weist auf der Ebene der mRNA eine Übereinstimmung von über 90 % mit *A. thaliana* auf und konnte deshalb für vergleichende Microarray-Analysen herangezogen werden. Die Auswertung der cDNA-Microarrays ergab, daß bei *A. thaliana* 40 Gene und bei *T. halophila* sechs Gene durch NaCl induziert wurden. Ein Vergleich der Datensätze ergab aber, daß nur zwei Gene in beiden Arten als induziert eingestuft wurden.

Die Auswertung der H-Cd Experimente ergab, daß wie bei *A. thaliana* die Anzahl der induzierten Sondensätze mehr als dreimal höher ist, aber die Überschneidung zwischen N-Cd und H-Cd war bei *A. halleri* mit nur 41 % deutlich geringer. Insgesamt konnten 11 Gene

⁷ Die Abweichung zu Tabelle 27 läßt sich dadurch erklären, daß unterschiedliche Sondensätze, die beide die ACC-Synthase 6 repräsentieren, in den *A. thaliana*- und *A. halleri*-Experimenten als induziert eingestuft wurden. Da die Hybridisierungseffizienz von Sondensatz zu Sondensatz unterschiedlich ist, können für zwei Sondensätze, die das gleiche Gen repräsentieren, unterschiedliche Werte erhalten werden. Aufgrund der Tatsache, daß die Induktionswerte für die ACC-Synthase 6 in beiden Spezies jeweils knapp über dem Schwellenwert lagen, ergab es sich, daß die Signalstärken einiger Sondensätze knapp über dem Schwellenwert und die anderer knapp darunter lagen.

ermittelt werden, die eine dosisabhängige Induktion zeigten. Diese geringe Überschneidung ist vielleicht dadurch zu erklären, daß die gewählte Cadmiumkonzentration (125 μM) zu sekundären Effekten führt, die nicht durch das Cd^{2+} -Ion selbst ausgelöst werden. Trotz der geringen Zahl an DCdI-Genen beinhaltet die Gruppe zwei Transkriptionsfaktoren, von denen einer (At2g44840) sogar eine 28- (N-Cd) bzw. 37fache (H-Cd) Transkriptakkumulation zeigte. Da die Expression dieses Gens in *A. thaliana* auch durch Cadmium (H-Cd) induziert wird, könnte dieser Transkriptionsfaktor vielleicht eine Rolle bei der Cadmiumakkumulation in *A. halleri* spielen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müßten die Gene identifiziert werden, welche von diesem Protein kontrolliert werden. Ein möglicher Ansatz hierfür wäre ein „Yeast one-hybrid screen“ (Sieweke, 2000). Sollte sich dabei herausstellen, daß eines oder mehrere der regulierten Gene putative Transporter sind, so könnte man damit die gemachte Annahme untermauern.

4.4.3 Kupfer (*A. thaliana* und *A. halleri*)

Neben der Analyse der Cd^{2+} -induzierten Streßantwort sollte auch der Effekt von Cu^{2+} auf molekularer Ebene untersucht werden. Dies sollte zur Identifizierung von gemeinsamen und spezifischen Reaktionsmechanismen führen. In beiden Arten war die Anzahl der durch Cu^{2+} induzierter Gene signifikant höher als bei den Cadmium-Experimenten.

Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, daß während der Streßbehandlung wesentlich mehr Kupferionen aufgenommen wurden, als Cadmiumionen bei den Cadmium-Experimenten. So konnte bei *A. thaliana* mit 2,2 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{mg TG}$ im Vergleich zu 570 $\text{ng Cd}^{2+}/\text{mg TG}$ die ca. vierfache Menge an Schwermetall nach Ende der Streßbehandlung gemessen werden, obwohl die gleiche Konzentration an Schwermetall (= 10 μM) bei beiden Experimenten verwendet wurde. Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, daß es für Kupfer spezifische Aufnahmetransporter gibt, wohingegen die Aufnahme von Cadmium wahrscheinlich über Transporter erfolgt, die normalerweise andere Ionen transportieren und eine geringe Substratspezifität aufweisen. Die unter diesen Bedingungen ermittelte zehnfach höhere Anzahl an induzierten SONDENSÄTZEN (N-Cd = 68; Cu = 682) beim Kupferexperiment deutet aber darauf hin, daß die höhere interne Konzentration nicht der einzige Grund für die höhere Anzahl an induzierten Genen sein könnte. Ein weiterer Grund ist möglicherweise darin zu sehen, daß Cu^{2+} -Ionen einen stärkeren Einfluß auf den Metabolismus haben als Cd^{2+} -Ionen. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da die Kupferhomöostase in der Pflanzenzelle sehr fein reguliert sein muß. Die Gefahr von oxidativen Schäden aufgrund freier Cu^{2+} -Ionen ist nämlich sehr groß (Rae *et al.*, 1999; Clemens, 2001). Dies bedeutet im Umkehrschluß, daß selbst kleinste Veränderungen bei der cytosolischen Kupferkonzentration durch regulatorische Prozesse ausgeglichen werden müssen. So konnte zum Beispiel in *E. coli* gezeigt werden, daß ein sensorisches Protein zeptomolare (10^{-21} M) Konzentrationen an freiem Cu^{2+} detektieren kann (Changela *et al.*, 2003).

Neben der hohen Zahl an induzierten Genen konnte auch ein signifikanter Rückgang der „present“-Einstufungen verzeichnet werden. So konnte im Fall von *A. thaliana* ein Rückgang von 5030 ± 284 (Kontrolle) auf 4215 ± 164 (Cu^{2+}) ermittelt werden. Der Rückgang war bei *A. halleri* nicht so deutlich, jedoch signifikant (Kontrolle: 2901 ± 145 ; Cu^{2+} : 2489 ± 256). Diese Reduktion ist gleichbedeutend mit der Abschaltung der entsprechenden Gene, was somit auf eine drastische Veränderung des Metabolismus hindeuten könnte. Die erniedrigte Anzahl an „present“-Ereignissen könnte aber auch technisch bedingt sein, da über eine

Vielzahl von unabhängigen Experimenten beobachtet wurde, daß die RNA aus kupferbehandelten Proben eine etwas geringere Qualität aufwies.

Bei der Betrachtung der *A. thaliana*-Experimente sticht ins Auge, daß die stärksten Induktionsfaktoren im dreistelligen Bereich liegen und beim BCBP (**B**lue **C**opper **B**inding Protein, At5g20230) sogar einen Wert von über 500 erreichen. Dieser hohe Induktionsfaktor konnte auch mittels quantitativer realtime-PCR bestätigt werden. Vergleiche mit anderen publizierten Microarray-Experimenten ergaben, daß die Expression dieses Gens durch verschiedene Faktoren induziert werden kann. So wurde neben der Cd^{2+} -Responsivität (siehe 3.3.4.1) eine höhere Expression nach H_2O_2 - (Desikan *et al.*, 2001) und Zinkstreß (Becher *et al.*, 2004) beobachtet. Allerdings lagen die Induktionsfaktoren in diesen Fällen weit unter den Werten des Cu^{2+} -Experimentes. Die *in silico*-Analyse des BCBP ergab, daß sowohl eine Cu^{2+} -Bindungsdomäne als auch ein GPI-Anker (**G**lycosyl-**P**hosphatidyl-**I**nositol) vorhergesagt werden. GPI-Anker tragende Proteine sind für den Transport zur Plasmamembran bestimmt, wo sie in der Form verankert werden, daß der Hauptteil des Proteins in Richtung des extrazellulären Raums weist (Sherrier *et al.*, 1999). Es wird postuliert, daß diese Proteine somit in einer Reihe von Prozessen, wie Signaltransduktion, Matrixorganisation oder Pathogenabwehr, involviert sein könnten (Borner *et al.*, 2003). Durch 2D-Gelelektrophorese und anschließende Massenbestimmung über LC-MS/MS konnten Borner *et al.* (2003) zeigen, daß das BCBP tatsächlich einen funktionellen GPI-Anker trägt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das BCBP zur Zelloberfläche transportiert wird, um dort vielleicht freie Cu^{2+} -Ionen zu komplexieren. In eigenen Experimenten konnte jedoch eine *in vivo*-Bindung von Cu^{2+} , mittels heterologer Expression in *Schizosaccharomyces pombe*, nicht bestätigt werden, da die exprimierenden Zellen stark in ihrem Wachstum gehemmt waren (Daten nicht gezeigt). Dieser Phänotyp konnte auch durch zusätzliche Gabe von Cu^{2+} nicht aufgehoben werden. Es ist also im Rahmen des Möglichen, daß es in der Hefe *S. pombe* zu einer falschen Lokalisation des Proteins kommt, wodurch das Wachstum der Zellen stark beeinträchtigt wird. Eine alternative Methode wäre die Expression des Gens in *Saccharomyces cerevisiae* oder die Verwendung einer verkürzten Version (ohne GPI-Anker), um das Problem der falschen Integration zu umgehen. Ein weiteres sinnvolles Experiment wäre die Herstellung von RNAi-Pflanzen, da eine T-DNA Insertionslinie für dieses Gen leider nicht verfügbar ist. Aufgrund der sehr starken Induktion nach zwei Stunden Kupferstreß ist anzunehmen, daß dieses Gen eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Cu^{2+} spielt und somit eine Inaktivierung dieses Gens einen deutlichen Einfluß auf die Kupfertoleranz haben könnte.

Ein weiteres interessantes Resultat der Kupferexperimente ist die erhöhte Expression einiger Gene, die in unmittelbarem Zusammenhang mit oxidativem Streß stehen. Hierbei handelt es sich um die drei Transkriptionsfaktoren *ZAT7*, *ZAT12* und *WRKY25*, deren Expression 41-, 37- bzw. 2,6fach erhöht ist. Für alle drei Gene konnte gezeigt werden, daß sie in H_2O_2 -behandelten Zellen höher exprimiert werden und darüber hinaus bei der Regulation der cytosolischen Ascorbat-Peroxidase eine wichtige Rolle spielen (Rizhsky *et al.*, 2004). Ferner war das Transkriptniveau einer Lipxygenase (At1g17420) stark erhöht, die auch in H_2O_2 -behandelten Zellkulturen von *A. thaliana* eine Responsivität zeigt (Desikan *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte bei einigen Peroxidasen (z.B. At5g06720, At5g39580) und GSH-S-Transferasen (At2g29450, At2g29440) ein zum Teil stark erhöhtes Transkriptniveau gemessen werden. Es ist in der Literatur beschrieben, daß sowohl Peroxidasen (Mittler, 2002) als auch GSH-S-Transferasen (Noctor & Foyer, 1998; Dixon *et al.*, 2002) bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies eine Rolle spielen.

Im Vergleich zu den Cd^{2+} -Experimenten ist zu erkennen, daß fast alle hier aufgeführten Enzyme ausschließlich durch Cu^{2+} induziert wurden. Diese Daten deuten darauf hin, daß die Belastung durch ROS bei den Cd^{2+} -Behandlungen deutlich niedriger ist. Dies ist insofern nicht überraschend, da Cu^{2+} ein sehr hohes Redoxpotential besitzt und ein sehr potenter Katalysator für die Generierung von ROS darstellt (Rae *et al.*, 1999; Schützendübel & Polle, 2002). Ein weiterer Hinweis auf die erhöhte Produktion von ROS ist in der höheren Expression der beiden Gene *AtZAT7* und *AtWRKY25* zu sehen. Arbeiten von Rizhsky *et al.* (2004) konnten zeigen, daß *AtZAT12* die Expression dieser beiden Gene aktivieren kann. Allerdings findet diese Induktion nur bei oxidativem Streß statt. Eine alleinige Überexpression von *AtZAT12*, ohne die vermehrte Bildung von ROS, führt also zu keinem Effekt. Betrachtet man sich in diesem Zusammenhang die Gruppe der NCdI-Gene aus *A. thaliana*, so ist zu erkennen, daß es zwar eine erhöhte Expression von *ZAT12* gibt, aber weder *ZAT7* noch *WRKY25* als induziert eingestuft werden. Dieses Ergebnis ist ebenfalls ein indirekter Hinweis dafür, daß unter moderatem Cadmiumstreß keine verstärkte Produktion von ROS stattfindet.

Wie bereits erwähnt, ist ein zentraler Toxizitätsmechanismus bei Kupferstreß die Bildung von ROS. Da diese Moleküle aufgrund ihrer hohen Reaktivität sehr gefährlich sind, besitzen Pflanzen eine Reihe von enzymatischen Detoxifizierungsmechanismen. In diesem Zusammenhang spielen vor allem Superoxid-Dismutasen, Ascorbat-Peroxidasen und Katalasen eine zentrale Rolle (Mittler, 2002). Allerdings ist keines dieser Enzyme auf den Listen der durch Cu^{2+} induzierten Gene vertreten. Dieser anscheinende Widerspruch ist jedoch zu erklären. Durch freie Kupferionen wird fast ausschließlich die Generierung von Hydroxylradikalen katalysiert (siehe Abbildung 36), die Substrate für die oben angeführten Enzyme stellen aber H_2O_2 und Superoxid-Radikale dar. Aus diesem Grund würde eine höhere Expression dieser Enzyme zu keinem nennenswerten Erfolg führen. Darüber hinaus ist anzunehmen, daß die Entgiftung von Hydroxylradikalen nicht auf enzymatischem Weg erfolgt (Schützendübel & Polle, 2002), da bis heute keine Enzyme bekannt sind, die eine solche Reaktion katalysieren können.

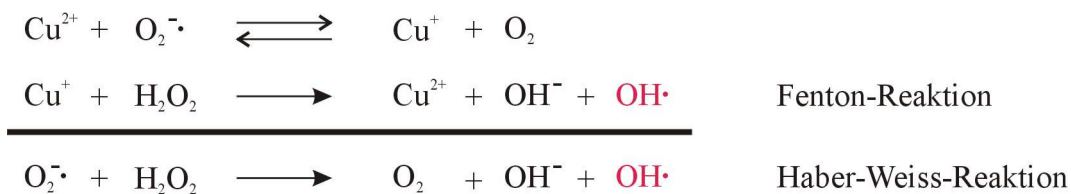


Abbildung 36: Die Haber-Weiss-Reaktion als Summe der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -vermittelten Cu^{2+} -Reduktion und der Fenton-Reaktion. Das biologisch relevante Ergebnis dieser Reaktion ist die Bildung von äußerst reaktiven Hydroxylradikalen (rot).

Bei der Gegenüberstellung der Datensätze von *A. thaliana* und *A. halleri* ist zu bemerken, daß es – im Gegensatz zu den Cadmiumexperimenten – eine relativ starke Überlappung zwischen den als induziert eingestuften Genen gibt. Diese Überlappung beträgt auf *A. halleri* bezogen über 75 % und beinhaltet unter anderem das BCBP (*At5g20230*) sowie einen putativen Transkriptionsfaktor (EREBP = *Atg44840*). Ferner ist, in Bezug auf diese beiden Gene, bemerkenswert, daß sie auch in *A. halleri* zu den am stärksten induzierten Genen zählen. Ein Abgleich mit Internetdatenbanken ergab darüber hinaus, daß die Responsivität des Transkriptionsfaktors (*Atg44840*) sehr spezifisch zu sein scheint. Unter 38 getesteten Bedingungen wurde lediglich bei NaCl-Streß eine vergleichbar starke Responsivität gemessen

(www.genevestigator.com; Zimmermann *et al.*, 2004). Ob diese hohe Spezifität auch einen Rückschluß auf eine zentrale Position im Signaltransduktionsnetzwerk zuläßt, müßte anhand von Experimenten mit Knockout-Pflanzen untersucht werden.

In Hinblick auf Gene, die im Zusammenhang mit oxidativem Streß stehen, konnten auch bei *A. halleri* zahlreiche Gene, wie z.B. eine Lipoxygenase, zwei Peroxidasen (At1g17490) und einige GSH-S-Transferasen identifiziert werden. Diese Ergebnisse belegen, daß auch in den Wurzeln von *A. halleri* vermehrt oxidativer Streß auftritt, trotz der Tatsache, daß die intrazellulären Kupferkonzentrationen mit durchschnittlich 1,19 µg Cu²⁺/mg TG um die Hälfte geringer sind als in *A. thaliana*. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die in beiden Arten gemessene Induktion der ACC-Synthase 6 (*A. thaliana*: 50fach; *A. halleri*: neunfach). Dies deutet darauf hin, daß wahrscheinlich auch bei der Kupferantwort Ethylen eine Rolle spielt.

Betrachtet man sich die absolute Zahl der als induziert eingestuften Genen so fällt auf, daß im Vergleich zu den N-Cd Experimenten etwa die zehnfach höhere Anzahl identifiziert wurde. Dieser Wert spiegelt fast exakt den Anstieg bei den *A. thaliana*-Experimenten wider.

4.4.4 Weiterführende Vergleiche aller Microarrays beider Arten

Durch die Gegenüberstellung aller durchgeführten Microarray-Experimente konnten verschiedene Kandidatenlisten erstellt werden, die Gene beinhalten, die in Bezug auf Schwermetalle wahrscheinlich eine besondere biologische Relevanz haben. Zum einen sind dies die Gene der Kernantwort, die möglicherweise Aufschluß über konservierte Mechanismen der Metallantwort geben könnten und zum anderen Gene, die möglicherweise für die Cadmiumhyperakkumulation von *A. halleri* wichtig sind.

4.4.4.1 Metallische Kernantwort

Die Gruppe der Kernantwort ist dadurch definiert, daß die Expression dieser Gene sowohl durch Cd²⁺-(NCdI), als auch durch Cu²⁺ induziert wird. Darüber hinaus muß diese Übereinstimmung in beiden Arten aufgetreten sein. Die fünf auf diese Weise identifizierten Gene können eindeutig den drei verschiedenen funktionellen Kategorien Signaltransduktion, Schwefelstoffwechsel und Ethylenbiosynthese zugeordnet werden. Drei der fünf Gene kodieren für (potentielle) Transkriptionsfaktoren und wurden deshalb in die Kategorie Signaltransduktion eingeordnet. Eine weitere Gemeinsamkeit ist, daß die drei Gene At5g59820 (*ZAT12*), At5g04340 (C2H2-Zinkfinger-Protein) und At3g28210 (putatives Zinkfinger-Protein) allesamt für Zinkfinger-Proteine kodieren. Bis heute ist nur ein Vertreter, nämlich *ZAT12*, in der Literatur beschrieben. Er steht in Zusammenhang mit der Regulation von zwei weiteren Transkriptionsfaktoren und der cytosolischen Ascorbat-Peroxidase unter oxidativem Streß (vgl 4.4.3). Da dieser Regulationsmechanismus jedoch nicht unter normalen Bedingungen (= kein oxidativer Streß) abläuft (Rizhsky *et al.*, 2004) und dieses Gen bei einer Vielzahl von Streßsituationen höher exprimiert wird (siehe Ergebnisteil; www.genevestigator.com), ist es anzunehmen, daß es sich bei diesem Gen um eine zentrale Komponente des pflanzlichen Signaltransduktionsnetzwerkes handelt. Das Auslösen einer spezifischen Reaktion innerhalb der Pflanzenzelle wird wahrscheinlich durch zusätzliche Faktoren (z.B. oxidativer Streß) gesteuert. Der Nachweis einer essentiellen Rolle im Metallhomöostase-Netzwerk durch die Analyse von Knockout-Pflanzen war nicht möglich. Sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch unter Kupferstreß, war kein Unterschied im

Wachstum zwischen Wildtyp- und Knockout-Pflanzen zu beobachten. Dieses Ergebnis scheint das oft erzielte Resultat zu bestätigen, daß bei der Inaktivierung eines Gens eine alternative Route den Ausfall kompensieren kann (Hussain *et al.*, 2004). Eine weitere Erklärung wäre darin zu sehen, daß bei dieser Linie lediglich eine Promotorinsertion ca. 300 bp stromaufwärts des Startcodons vorliegt. Da eine Analyse der Transkriptmenge in den Knockout-Pflanzen nicht vorgenommen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß der Promotor noch eine geringe Aktivität zeigt und kleine Mengen an Transkript gebildet werden. Auch die Untersuchungen an den At3g28210-Knockout-Pflanzen (putatives Zinkfinger-Protein) führten zu keiner Identifizierung eines metallspezifischen Phänotyps. Somit konnte auch für dieses Gen festgestellt werden, daß es – unter den getesteten Bedingungen – keine zentrale Rolle in der Signaltransduktionskaskade spielt. In Anbetracht der Tatsache, daß die Expression alle drei identifizierten Transkriptionsfaktoren durch eine Reihe von verschiedenen Streßsituation induziert wird (www.genevestigator.com), liegt die Vermutung nahe, daß diese Gene in generelle Regulationsprozesse involviert sind und nicht als metallspezifisch eingestuft werden können.

Das vierte Gen, das zur Gruppe der Kernantwort zählt, ist die ATP-Sulfurylase, welche den ersten Schritt der Schwefelassimilation in Pflanzen katalysiert. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß unter Metallstreß wahrscheinlich eine Aktivierung des Schwefelstoffwechsels stattfindet. Angesichts der Tatsache, daß ein wichtiger Mechanismus zur Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Detoxifizierung die Produktion von GSH ist (Xiang & Oliver, 1998), ist eine Steigerung des Schwefelstoffwechsels nachvollziehbar.

Die ACC-Synthase 6 ist das letzte Gen aus der Kernantwort-Gruppe und katalysiert den ersten Schritt der Ethylenbiosynthese. Dies deutet darauf hin, daß Ethylen vielleicht als Signalmolekül bei der pflanzlichen Metallantwort fungiert. Es ist bereits bekannt, daß die Ethylenbiosynthese durch verschiedene abiotische Faktoren wie Kälte, Verwundung und Trockenheit beeinflusst wird (Zhao & Schaller, 2004). Da aber das Hormon in einer großen Vielzahl von Prozessen, von Streßantwort über Blütenbildung bis Seneszenz, eine wichtige Rolle spielt (Chang & Shockey, 1999; Stepanova & Ecker, 2000), ist es nötig, weitere molekulare „Schalter“ zu identifizieren, die für eine spezifische Umsetzung des Signals Ethylen verantwortlich sind. Einen möglichen Hinweis darauf könnten die zahlreichen ethylenresponsiven Transkriptionsfaktoren geben, die im Zuge der hier beschriebenen Microarray-Studien identifiziert wurden.

4.4.4.2 Cd^{2+} -spezifische Gene

Im Gegensatz zu *A. thaliana* ist *A. halleri* ja in der Lage, Zink und Cadmium im Sproß zu hyperakkumulieren (Küpper *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Dies bedeutet, daß es in *A. halleri* molekulare Mechanismen geben muß, die für diesen Phänotyp verantwortlich sind. Eine Identifikation dieser Prozesse wurde durch die vergleichende Transkriptomanalyse angestrebt (siehe 1.10). Ein möglicher Weg zur Identifizierung von Cd^{2+} -Hyperakkumulationsfaktoren ist die Gegenüberstellung von Genen, die in *A. thaliana* durch Cd^{2+} -Gabe induziert werden und gleichzeitig in *A. halleri* konstitutiv höher exprimiert werden. Neben einem Mannose-bindenden Protein (At1g78830) und einem PR1-ähnlichen Protein (At4g33710), erfüllen die beiden Gene *ZIP4* (At1g10970) und *ZIP9* (At4g33020) diese Kriterien. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei diesen laut Computervorhersagen um putative $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$ -Transporter. Die tatsächliche Aufgabe in der Pflanze ist aber noch immer unklar, da es weder erfolgreiche Transportstudien noch einen experimentellen Hinweis auf die

Lokalisation in der Zelle gibt. Deshalb können über die Rolle bei der Hyperakkumulation in *A. halleri* nur vage Spekulationen geäußert werden. Diese Transporter könnten also sowohl für eine Aufnahme von Ionen aus dem Boden, als auch für eine Mobilisierung aus der Vakuole verantwortlich sein. Beide Prozesse jedoch würden zu einer höheren cytosolischen Konzentration von mobilen Cd^{2+} -Ionen führen, welche ihrerseits für eine Translokation in den Sproß verfügbar wären. Da eine solche Konstellation ein wichtiges Kriterium für die Metall-Hyperakkumulation ist (Chaney *et al.*, 1997), könnte diese Vermutung eine mögliche Erklärung für die Cadmium-Akkumulation in *A. halleri* sein. Um die Annahmen dieser Hypothese zu stützen, ist jedoch eine genaue Lokalisierung der Transporter sowie eine Charakterisierung der Transportaktivitäten unerlässlich. Einen ersten Hinweis könnte aber auch die Analyse von Knockout-Pflanzen geben.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von Cd^{2+} -Hyperakkumulationsfaktoren ist die Gegenüberstellung von Genen, die ausschließlich in *A. halleri* cadmiumresponsiv sind. Diese Analyse führte zu einer Liste von 20 Genen, von denen sechs als putative Transkriptionsfaktoren klassifiziert werden. Als besonders interessant ist die Tatsache einzustufen, daß durch den Vergleich mit Internetdatenbanken (www.genevetigator.com) gezeigt werden konnte, daß bei drei dieser Gene eine sehr große Cd^{2+} -Spezifität zu bestehen scheint. Hierbei handelt es sich um einen AP2-Domäne- (At1g78080) und einen Scarecrow-Transkriptionsfaktor (At2g45160), die anderweitig lediglich bei seneszenten Pflanzen etwas höher exprimiert sind. Die scheinbar höchste Spezifität weist jedoch ein MYB-Transkriptionsfaktor (At1g35515) auf, dessen Transkription – basierend auf den verfügbaren Microarray-Daten – nur durch niedrige Cd^{2+} -Konzentrationen ausschließlich in *A. halleri* induziert wird. Da keiner dieser drei Kandidaten bis heute in der Literatur beschrieben ist, kann eine weitere Einordnung dieser Gene leider nicht vorgenommen werden. Eine heterologe Expression dieser Gene in *A. thaliana* könnte einen Aufschluß darüber geben, ob diese Transkriptionsfaktoren tatsächlich eine wichtige Funktion bei der Cadmium-hyperakkumulation spielen. Gesetzt den Fall, die höhere Expression eines dieser Gene würde zu einer höheren Cadmiumakkumulation in *A. thaliana* führen, könnten im nächsten Schritt die Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren identifiziert und charakterisiert werden, um einen tieferen Einblick in das Metallhomöostase-Netzwerk zu erhalten.

5 Zusammenfassung

5.1 Identifikation potentieller Hyperakkumulationsfaktoren in *A. halleri*

Die Hyperakkumulation von Zink und Cadmium ist eine konstitutive Eigenschaft des Metallophyten *Arabidopsis halleri*. Diese Pflanze unterscheidet sich in dieser Eigenschaft sehr stark von ihrer nahen Verwandten *Arabidopsis thaliana*. Aus diesem Grund sollten mittels speziell für *A. thaliana* entwickelter „Arabidopsis genome arrays“ (Affymetrix, Santa Clara, USA) Gene identifiziert werden, die unter Kontrollbedingungen (= kein Schwermetallstreß) in den Wurzeln von *A. halleri* höher exprimiert werden, als in den Wurzeln von *A. thaliana*. Anfangs mußte aber zuerst die technische Durchführbarkeit dieses Experimentes überprüft werden, da es bis dato in der Literatur noch keine Hinweise über diesen experimentellen Ansatz gab. Nachdem durch Scatter-Plot-Analysen gezeigt werden konnte, daß die Verwendung von „Arabidopsis genome arrays“ auch bei *A. halleri* zu aussagekräftigen und verlässlichen Daten führt, konnte mit der eigentlichen Suche nach Kandidatengenomen begonnen werden. Durch die folgende Analyse konnten 72 Gene herausgefiltert werden, die in *A. halleri* stärker exprimiert werden. Für mindestens sechs Gene war es möglich, aufgrund der Annotierung, eine Verbindung zur Metallhomöostase zu postulieren. Die beiden interessantesten Mitglieder dieser Gruppe sind zum einen die Nicotianamin-Synthase 2, die den stärksten gemessenen Expressionsunterschied zeigte und zum anderen der putative Zn^{2+}/Cd^{2+} -Transporter ZIP9. Darüber hinaus konnten noch weitere (putative) Schwermetall-Transporter (ZIP4, NRAMP3, HMA3), sowie die O-Acetylserin-(thiol)-Lyase A2 identifiziert werden. Das höhere Expressionsniveau in den Wurzeln von *A. halleri* konnte für alle diese Gene mittels RT-PCR bestätigt werden.

Darüber hinaus zeigte sich, daß die Expression der beiden Gene *NAS2* und *ZIP9* sowohl in den Wurzeln von *A. thaliana*, als auch in den Wurzeln von *A. halleri* durch Veränderungen der externen Zinkversorgung beeinflusst werden. Für beide Gene konnte jedoch unter keiner der getesteten Kulturbedingungen eine Expression im Sproß detektiert werden.

Die Klonierung des Gens *AtZIP9* ergab, daß die in den Datenbanken verzeichnete Primärsequenz von *AtZIP9* nicht vollständig ist. Das komplette Protein umfaßt insgesamt 391 AS und hat somit eine mit dem homologen Transporter *AhZIP9* (386 AS) vergleichbare Größe. Die heterologe Expression der beiden Gene in *S. cerevisiae* verlief ohne Erfolg, weshalb über die Transportaktivitäten der Proteine keine Aussagen gemacht werden können.

Die heterologe Expression der *AtNAS2* in der zinksensitiven *Schizosaccharomyces pombe*-Mutante *Dzhf* führte jedoch zu einer gesteigerten Zinktoleranz, wodurch – nach unserem Wissen – der erste Beweis für eine *in vivo* Zn^{2+} -Bindung von Nicotianamin erbracht wurde. Dieses Ergebnis und die höhere Protein- bzw. NA-Konzentration in Wurzeln von *A. halleri* läßt die Vermutung zu, daß es sich bei NA um einen potentiellen Hyperakkumulationsfaktor handelt.

Mit diesen Experimenten konnte also gezeigt werden, daß eine speziesübergreifende Transkriptomanalyse nahe verwandter Arabidopsisarten mit Hilfe von „Arabidopsis genome arrays“ möglich ist und zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen, wie z.B. der Identifizierung potentieller Hyperakkumulationsfaktoren, beitragen kann.

5.2 Identifikation und Charakterisierung metallregulierter Gene

Neben der Identifizierung von Hyperakkumulationsfaktoren wurde mittels „Arabidopsis genome arrays“ und cDNA-AFLP auch an der Identifizierung und Charakterisierung von metallregulierten Genen aus *A. thaliana* und *A. halleri* gearbeitet. Über cDNA-AFLP konnten drei Kandidaten identifiziert werden, die eine kupferspezifische Induktion zeigten. Hierbei handelt es um Gene, die für ein Calmodulin-ähnliches Protein (At5g42380), ein putatives Calmodulin (At1g76650) und den Transkriptionsfaktor WRKY18 (At4g31800) kodieren. Zwei dieser Gene (At5g42380, At1g76650) zeigten bereits bei geringen Erhöhungen der externen Cu^{2+} -Konzentration eine transkriptionelle Responsivität. Die Analyse von Knockout-Pflanzen, bei denen entweder das Gen At1g76650 oder At5g42380 inaktiviert war, ergab, daß unter den getesteten Bedingungen keine Veränderung der Metalltoleranz zu beobachten war.

Im Zuge der Microarray-Analysen wurden die hydroponisch kultivierten Pflanzen mit Cd^{2+} und Cu^{2+} gestreßt. Durch diese Vorgehensweise war es möglich, eine cadmium- bzw. kupferspezifische Metallantwort zu identifizieren. Ferner sollte geklärt werden, ob es Gene gibt, die sowohl durch beide Metalle, als auch in beiden Arabidopsisarten induziert werden (= „Kernantwort“). Die Untersuchung der transkriptionellen Antwort auf Cadmiumstreß ergab, daß in *A. thaliana* vor allem Hitzeschockproteine vermehrt exprimiert werden, wohingegen in *A. halleri* die erhöhte Expression vieler putativer Transkriptionsfaktoren zu beobachten war. Die dosisabhängige Induktion von zwei putativen Zinktransportern (ZIP4, ZIP9) in *A. thaliana* deutet darauf hin, daß es unter Cadmiumstreß zu einer funktionellen Zinkdefizienz kommt. Bei *A. halleri* konnte eine gesteigerte Expression dieser Gene nicht beobachtet werden, was aber aufgrund des bereits konstitutiv erhöhten Transkriptniveaus nicht verwunderlich ist.

Im Gegensatz zu den Cadmium-Experimenten konnte bei den Kupfer-Experimenten unter den induzierten SONDENSÄTZEN beider Arten ein erhöhter Anteil an Genen identifiziert werden, die an der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind. Dieses Ergebnis gibt einen indirekten Hinweis darauf, daß es bei einer erhöhten cytosolischen Cu^{2+} -Konzentration zur vermehrten Bildung von ROS kommt. Ferner war in beiden Arten zu beobachten, daß die absolute Anzahl an induzierten Genen deutlich höher war, als bei den Cadmium-Experimenten.

Durch die Gegenüberstellung aller Microarray-Experimente konnten fünf Gene identifiziert werden, die sowohl durch beide Metalle, als auch in beiden Arten induziert wurden. Zu dieser Gruppe der „Kernantwort“ zählen drei Transkriptionsfaktoren (At5g59820, At5g04340, At3g28210), eine ATP-Sulfurylase (At4g14680) und die ACC-Synthase 6 (At4g11280). Dieser Vergleich könnte eine Möglichkeit darstellen, Mechanismen zu identifizieren, die bei Pflanzen in Bezug auf Schwermetallstreß spezieübergreifend von Bedeutung sind.

6 Literaturverzeichnis

- Allen, G.J., Chu, S.P., Harrington, C.L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tang, Y.Y., Grill, E., and Schroeder, J.I. (2001). A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**, 1053-1057.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Andrews, N.C. (2002). Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 181-186.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Assuncao, A.G.L., da Costa Martins, P., de Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., and Aarts, M. G. M. (2000). Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* **23**, 1-11.
- Bachem, C.W., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., and 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.
- Baenker, H.W., Fritze, D., Füeßl, H.S., Goeckenjan, G., Hamm, C., Harenberg, J., Hebe, J., Hengstmann, J.H., Hörl, W.H., Klingmüller, D., Köster, R., Küchenhoff, J., Kuck, K.H., Ludwig, M.M., Matzdorf, A., Nienaber, C., Riede, U.N., Rösch, W., Rudolf, G., Schaefer, G., Schuchert, A., Schweikert, A., Siebels, J., Terres, W., Wahl, P., and Ziegler, R. (1999). *Innere Medizin*. (Stuttgart: Hippokrates Verlag).
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* **3**, 643-654.
- Baker, A.J.M., and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**, 81-126.
- Barcelo, J., and Poschenrieder, C. (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress. *J. Plant Nutr.* **13**, 1-37.
- Becher, M. (2003). Untersuchungen zur Zinkhyperakkumulation in *Arabidopsis halleri* auf physiologischer und molekularbiologischer Ebene (*Dissertation*, Universität Potsdam).
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., and Krämer, U. (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J* **37**, 251-268.
- Becker, R., Fritz, E., and Manteuffel, R. (1995). Subcellular localization and characterization of excessive iron in the Nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. *Plant Physiol* **108**, 269-275.
- Benes, L., Schreiber, K., Ripperger, H., and Kitchess, A. (1983). Metal complex formation of nicotianamine, a possible phytosiderophore. *Experientia* **39**, 261-262.
- Berrocal-Lobo, M., and Molina, A. (2004). Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 763-770.

- Bert, V., Macnair, M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., and Petit, D.** (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* **146**, 225-233.
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., de Laguerie, P., and Petit, D.** (2002). Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* **155**, 47-57.
- Bird, A.J., McCall, K., Kramer, M., Blankman, E., Winge, D.R., and Eide, D.J.** (2003). Zinc fingers can act as Zn^{2+} sensors to regulate transcriptional activation domain function. *Embo J* **22**, 5137-5146.
- Borner, G.H., Lilley, K.S., Stevens, T.J., and Dupree, P.** (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol* **132**, 568-577.
- Brennan, R.J., and Schiestl, R.H.** (1996). Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat Res* **356**, 171-178.
- Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J., and Manners, J.M.** (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**, 1020-1032.
- Buckley, B.A., Place, S.P., and Hofmann, G.E.** (2004). Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. *J Exp Biol* **207**, 3649-3656.
- Cakmak, I.** (2000). Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* **146**, 185-205.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., and Baker, A.J.** (1997). Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 279-284.
- Chang, C., and Shockey, J.A.** (1999). The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 352-358.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., and Mondragon, A.** (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**, 1383-1387.
- Chen, C., and Chen, Z.** (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by *AtWRKY18*, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol* **129**, 706-716.
- Chismar, J.D., Mondala, T., Fox, H.S., Roberts, E., Langford, D., Masliah, E., Salomon, D.R., and Head, S.R.** (2002). Analysis of result variability from high-density oligonucleotide arrays comparing same-species and cross-species hybridizations. *Biotechniques* **33**, 516-524.
- Choi, Y.E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T., and Sano, H.** (2001). Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* **213**, 45-50.
- Christianson, D.W.** (1991). Structural biology of zinc. *Adv Protein Chem* **42**, 281-355.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., and 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.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.
- Clemens, S., Schroeder, J.I., and Degenkolb, T.** (2001). *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur J Biochem* **268**, 3640-3643.
- Clemens, S., Palmgren, M.G., and Krämer, U.** (2002a). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* **7**, 309-315.

- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D.H., and 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.
- Cobbett, C.S.** (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**, 825-832.
- Cobbett, C., and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 159-182.
- Coleman, J.E.** (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* **61**, 897-946.
- Connolly, E.L., Fett, J.P., and 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., Strain, J., Casareno, R.L., Krems, B., and 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., and Briat, J.F.** (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J* **347**, 749-755.
- Das, P., Samantary, S., and Rout, G.R.** (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* **98**, 29-36.
- Day, I.S., Reddy, V.S., Shad Ali, G., and Reddy, A.S.** (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **3**, research 0056.1-0056.24.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., van Hummelen, P., Zabeau, M., and van der Straeten, D.** (2004). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J* **39**, 537-559.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., and Neill, S.J.** (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**, 159-172.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., and Edwards, R.** (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol* **3**, reviews 3004.1-3004.10.
- Dominguez-Solis, J.R., Gutierrez-Alcala, G., Romero, L.C., and Gotor, C.** (2001). The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem* **276**, 9297-9302.
- Douchkov, D.** (2003). Nicotianamine synthase: gene isolation, gene transfer and application for the manipulation of metal assimilation (*Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge, A.G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P., and Krämer, U.** (2004). Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *Plant J* **39**, 425-439.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., and 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.
- Elmsley, J.** (2001). Nature's Building Blocks. An A-Z Guide to the Elements. (Oxford: Oxford university press).
- 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., and Paabo, S.** (2002). Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science* **296**, 340-343.
- Friedrich, K.L., Giese, K.C., Buan, N.R., and Vierling, E.** (2004). Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes. *J Biol Chem* **279**, 1080-1089.

- Fritsche, T.** (2004). Funktionelle Charakterisierung der MAP-Kinase MPK11 aus *Arabidopsis thaliana* (Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Gaynard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferriere, N., Thibaud, J.B., and Sentenac, H.** (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-655.
- Godbold, D.L., Horst, W.J., Collins, J.C., Thurman, D.A., and Marschner, H.** (1984). Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *J. Plant Physiol* **116**, 59-69.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4645-4649.
- Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2004). *AtHMA3*, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *Eur J Biochem* **561**, 22-28.
- Grill, E., Winnacker, E.L., and 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., and 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* **1465**, 190-198.
- Hall, J.L.** (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**, 1-11.
- Hamer, D.H., Thiele, D.J., and Lemontt, J.E.** (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* **228**, 685-690.
- Hamer, D.H.** (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**, 913-951.
- Heiss, S., Schafer, H.J., Haag-Kerwer, A., and 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.
- Heldt, H.W.** (1999). Pflanzenbiochemie. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- Hell, R., Jost, R., Berkowitz, O., and Wirtz, M.** (2002). Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **22**, 245-257.
- Hell, R., and Stephan, U.W.** (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541-551.
- Herbik, A., Koch, G., Mock, H.P., Dushkov, D., Czihal, A., Thielmann, J., Stephan, U.W., and Bäumlein, H.** (1999). Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants. *Eur J Biochem* **265**, 231-239.
- Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., and Mori, S.** (1999). Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol* **119**, 471-480.
- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S.J., Culotta, V.C., Penarrubia, L., and Amasino, R.M.** (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**, 1227-1234.
- Himelblau, E., and Amasino, R.M.** (2000). Delivering copper within plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 205-210.

- Hirayama, T., Kieber, J.J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J.M., Dailey, W.P., Dancis, A., and 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.
- Ho, E., Courtemanche, C., and Ames, B.N.** (2003). Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J. Nutr.* **133**, 2543-2548.
- Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., and Cobbett, C.S.** (1995). Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol* **107**, 1059-1066.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., and Cobbett, C.S.** (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1327-1339.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., and Shinozaki, K.** (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J* **24**, 655-665.
- Inoue, H., Higuchi, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2003). Three rice nicotianamine synthase genes, *OsNAS1*, *OsNAS2*, and *OsNAS3* are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant J* **36**, 366-381.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *Embo J* **19**, 6150-6161.
- Jost, R., Berkowitz, O., Wirtz, M., Hopkins, L., Hawkesford, M.J., and Hell, R.** (2000). Genomic and functional characterization of the oas gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **253**, 237-247.
- Kahle, H.** (1993). Response of roots of trees to heavy metals. *Environ Exp Bot* **33**, 99-119.
- Kamizono, A., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., and 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., and van Montagu, M.** (1995). Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* **270**, 28479-28486.
- Karley, A.J., Leigh, R.A., and Sanders, D.** (2000). Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends Plant Sci* **5**, 465-470.
- Knight, H., and Knight, M.R.** (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**, 262-267.
- Koch, M., Bishop, J., and Mitchell-Olds, T.** (1999). Molecular systematics and evolution of *Arabidopsis* and *Arabis*. *Plant Biology* **1**, 529-537.
- Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2004). *OsYSL2* is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J* **39**, 415-424.
- Koncz, C., and 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.*, 383-396.
- Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L., and 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.

- Krämer, U., Cotter-Howels, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., and Smith, J.A.** (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**, 635-638.
- Krämer, U., and Chardonens, A.N.** (2001). The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 661-672.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., and Harper, J.F.** (2002). Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**, 2129-2141.
- Krupa, Z.** (1988). Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting complex II in radish cotyledons. *Physiol. Plant* **73**, 518-524.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., and McGrath, S.P.** (2000). Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**, 75-84.
- Lane, B., Kajioka, R., and Kennedy, T.** (1987). The wheat-germ E_c protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem Cell Biol* **65**, 1001-1005.
- Lane, T.W., and Morel, F.M.** (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4627-4631.
- Lasat, M.M., Baker, A.J., and 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.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., and Kochian, L.V.** (2000). Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* **51**, 71-79.
- Lawrence, R.J., and Pikaard, C.S.** (2003). Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. *Plant J* **36**, 114-121.
- Li, T., and Xiong, Z.** (2004). A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals. *Environ Toxicol* **19**, 95-102.
- Lin, S.J., and 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.
- Ling, H.Q., Koch, G., Bäumlein, H., and Ganai, M.W.** (1999). Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7098-7103.
- Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Young, S.D., and Sacchi, G.A.** (2001). Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist* **149**, 53-60.
- Lombi, E., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.J., Hawkesford, M.J., and McGrath, S.P.** (2002). Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* **128**, 1359-1367.
- Ma, J.F., and Nomoto, K.** (1993). Inhibition of mugineic acid-ferric complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiol. Plant* **89**, 331-334.
- Mao, C., Yi, K., Yang, L., Zheng, B., Wu, Y., Liu, F., and Wu, P.** (2004). Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J Exp Bot* **55**, 137-143.
- Marschner, H., and Römheld, V.** (1994). Strategies of plants acquisition of iron. *Plant Soil* **165**, 261-274.
- Marschner, H.** (1995). Mineral nutrition of higher plants. (London: Academic press limited).

- Mattoo, A.K., Baker, J.E., and Moline, H.E.** (1986). Induction by copper ions of ethylene production in *Spirodela oligorrhiza*: evidence for a pathway independent of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *J. Plant Physiol* **123**, 193-202.
- McCall, K.A., Huang, C.C., and Fierke, C.A.** (2000). Function and mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J. Nutr.* **130**, 1437-1446.
- McNair, M.R.** (2002). Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* **155**, 59-66.
- Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L., and Williams, L.E.** (2003). Functional expression of *AtHMA4*, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *Plant J* **35**, 164-176.
- Mira, H., Martinez-Garcia, F., and Penarrubia, L.** (2001). Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J* **25**, 521-528.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**, 405-410.
- Munne-Bosch, S., Penuelas, J., Asensio, D., and Llusia, J.** (2004). Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of holm oak to heat and drought stress. *Plant Physiol.* **136**, 2937-2947.
- Noctor, G., and Foyer, C.H.** (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 249-279.
- Olson, M.F., and Marais, R.** (2000). Ras protein signalling. *Semin Immunol* **12**, 63-73.
- Outten, C.E., and O'Halloran, T.V.** (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488-2492.
- Pena, M.M., Puig, S., and Thiele, D.J.** (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* **275**, 33244-33251.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., and 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.
- Pich, A., and Scholz, G.** (1991). Nicotianamine and the distribution of iron into apoplast and symplast of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *J Exp Bot* **42**, 1517-1523.
- Pich, A., Manteuffel, R., Hillmer, S., Scholz, G., and Schmidt, W.** (2001). Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* **213**, 967-976.
- Puig, S., and Thiele, D.J.** (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 171-180.
- Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C., and O'Halloran, T.V.** (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284**, 805-808.
- Rausser, 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.
- Rizhsky, L., Davletova, S., Liang, H., and Mittler, R.** (2004). The zinc finger protein *Zat12* is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279**, 11736-11743.
- Rogers, E.E., Eide, D.J., and Guerinot, M.L.** (2000). Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12356-12360.
- Rogers, E.E., and Guerinot, M.L.** (2002). *FRD3*, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1787-1799.
- Römheld, V., and Marschner, H.** (1986). Evidence for a special uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol* **80**, 175-180.

- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J.P., Deus-Neumann, B., and Zenk, M.H.** (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* **47**, 339-347.
- Salt, D.E., Smith, R.D., and Raskin, I.** (1998). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 643-668.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sancenon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J., and Penarrubia, L.** (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **51**, 577-587.
- Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann, J.L., Traverse, A., Marcus, M.A., and Manceau, A.** (2002). Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* **130**, 1815-1826.
- Schaaf, G., Ludewig, U., Erenoglu, B.E., Mori, S., Kitahara, T., and von Wirén, N.** (2004). *ZmYSI* functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* **279**, 9091-9096.
- Schmidke, I., and Stephan, U.W.** (1995). Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiol. Plant* **95**, 147-153.
- Schützendübel, A., and Polle, A.** (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* **53**, 1351-1365.
- Sherrier, D.J., Prime, T.A., and Dupree, P.** (1999). Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis* **20**, 2027-2035.
- Siedlecka, A., and Baszynsky, T.** (1993). Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplasts of cadmium-treated maize plants is due to cadmium-induced iron deficiency. *Physiol. Plant* **87**, 199-202.
- Siegenthaler, W.** (2000). Differentialdiagnose innerer Krankheiten. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Sieweke, M.** (2000). Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* **130**, 59-77.
- Sitzmann, F. C.** (2002). Pädiatrie (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Snedden, W., and Fromm, H.** (2001). Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytologist* **151**, 35-66.
- Song, W.Y., Sohn, E.J., Martinoia, E., Lee, Y.J., Yang, Y.Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., and Lee, Y.** (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat Biotechnol* **21**, 914-919.
- Stepanova, A.N., and Ecker, J.R.** (2000). Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 353-360.
- Stephan, U.W., and Scholz, G.** (1993). Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol. Plant* **88**, 522-529.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D.** (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**, 321-336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M.** (2000). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **19**, 201-213.
- Sun, W., Van Montagu, M., and Verbruggen, N.** (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 1-9.
- Suzuki, K., Higuchi, K., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., and Mori, S.** (1999). Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**, 993-1002.
- Suzuki, N., Koizumi, N., and Sano, H.** (2001). Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **24**, 117-1188.

- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J.K., and Shinozaki, K.** (2004). Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. *Plant Physiol* **135**, 1697-1709.
- Takagi, S., Nomoto, K., and Takemoto, T.** (1984). Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.* **7**.
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., and Nishizawa, N.K.** (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* **15**, 1263-1280.
- Tester, M., and Leigh, R.A.** (2001). Partitioning of nutrient transport processes in roots. *J Exp Bot* **52**, 445-457.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., and 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.
- Thomine, S., Lelievre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I., and Barbier-Brygoo, H.** (2003). *AtNRAMP3*, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* **34**, 685-695.
- Tolay, I., Erenoglu, B., Romheld, V., Braun, H.J., and Cakmak, I.** (2001). Phytosiderophore release in *Aegilops tauschii* and *Triticum* species under zinc and iron deficiencies. *J Exp Bot* **52**, 1093-1099.
- Tseng, T.S., Tzeng, S.S., Yeh, C.H., Chang, F.C., Chen, Y.M., and Lin, C.Y.** (1993). The heat-shock response in rice seedlings - isolation and expression of cDNAs that encode class-I low-molecular-weight heat-shock proteins. *Plant and Cell Physiology* **34**, 165-168.
- Unthan, T.** (2004). Untersuchungen zur Rolle der Nicotianamin-Synthese für die Metallhyperakkumulation (*Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Vallee, B.L., and Auld, D.S.** (1990). Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 220-224.
- van Assche, F., and Clijsters, H.** (1986). Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose- 1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Plant Physiol* **125**, 355-360.
- van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A., and Hooykaas, P.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.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., and 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.
- Verkleij, J.A.C., and Schat, H.** (1990). Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press.
- Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F., and Curie, C.** (2002). *IRT1*, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.
- Vess, C.** (2003). Identifizierung und Charakterisierung schwermetallregulierter Gene im Metallophyten *Arabidopsis halleri* und in *Arabidopsis thaliana* (*Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., and Gros, P.** (1993). Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**, 469-485.

- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., and Labarre, J.** (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**, 8469-8474.
- Vierling, E.** (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 579-620.
- von Wirén, N., Mori, S., Marschner, H., and Römheld, V.** (1994). Iron inefficiency in maize mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiol* **106**, 71-77.
- von Wirén, N., Marschner, H., and Römheld, V.** (1996). Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated Zinc. *Plant Physiol* **111**, 1119-1125.
- von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A., and Hider, R.C.** (1999). Nicotianamine chelates both Fe(III) and Fe(II). Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* **119**, 1107-1114.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E., and Clemens, S.** (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* **37**, 269-281.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-590.
- Whiting, S.N., de Souza, M.P., and Terry, N.** (2001). Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ Sci Technol* **35**, 3144-3150.
- Williams, R.J.P.** (1989). Zinc in human biology. (Berlin: Springer-Verlag).
- Wirtz, M., Berkowitz, O., Droux, M., and Hell, R.** (2001). The cysteine synthase complex from plants. Mitochondrial serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* carries a bifunctional domain for catalysis and protein-protein interaction. *Eur J Biochem* **268**, 686-693.
- Woeste, K.E., and 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.
- Xiang, C., and 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., and Oliver, D.J.** (1999). A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* **40**, 711-717.
- Youssefian, S., Nakamura, M., Orudjev, E., and Kondo, N.** (2001). Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-acetylserine(thiol) lyase modifies plant responses to oxidative stress. *Plant Physiol* **126**, 1001-1011.
- Zhang, F.S., Römheld, V., and Marschner, H.** (1991). Diurnal rhythm of release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron-deficient wheat. *Soil Sci. Plant Nutr.* **37**, 671-678.
- Zhao, H., and Eide, D.** (1996a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2454-2458.
- Zhao, H., and Eide, D.** (1996b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**, 23203-23210.
- Zhao, H., and Eide, D.** (1997). Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 5044-5052.

-
- Zhao, F.J., Lombi, E., Brendon, T., and McGrath, S.P.** (2000). Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant, Cell and Environment* **23**, 507-514.
- Zhao, X.C., and Schaller, G.E.** (2004). Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **562**, 189-192.
- Zhu, T., and Wang, X.** (2000). Large-scale profiling of the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Physiol* **124**, 1472-1476.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.

Anhang A: verwendete Oligonukleotide

Tabelle 29: Zusammenstellung aller verwendeter Oligonukleotide. Primerabschnitte, die in klein geschrieben sind, binden beim ersten Zyklus nicht an die Matrize und dürfen deshalb nicht in die Berechnung der Schmelztemperatur einbezogen werden.

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle	Bemerkung
ProNAS2 -fw	GATGAGACGAAGTGGTGAATCC	-	Amplifikation <i>AhNAS2</i> -Promotor
ProNAS2 -rev	GTGTCGACATTCTTGGATGG	-	Amplifikation <i>AhNAS2</i> -Promotor
NAS-planta-fw	gcgcgatccGCCTAAATTACCAACTAGCTCG	<i>Bam</i> HI	Amplifikation Pro-cds-Ter <i>AhNAS2</i>
NAS-planta-rev	gcgcgatccCTGCTTTGAATTCAGACCGTCTCG	<i>Bam</i> HI	Amplifikation Pro-cds-Ter <i>AhNAS2</i>
LBa1	TGGTTACGTAGTGGCCATCG	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
Calmo-T-DNA	CCTCGAAGAGATCAGAATCG	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
Calmo-WT-fw	gcggtgcgccgcACTCTCGCTAAGAACCAA	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
Calmo-WT-rev	ccgcagatctTCAACGCATCATCAAAAC	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
putCal-T-DNA	CAACATCCCATCTCCGTCCG	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
putCal-WT-fw	gcgagatctATGAAGAATAATACTCAACC	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
putCal-WT-rev	gcgcgccgcAGCGCATCATAAGAGCAAAC	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ZAT12 T-DNA	ACCTCCTAAGGCTTGGAAACG	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ZAT12 WT-fw	CTTAGAAGCATTTCAAACGG	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ZAT12 WT-rev	ACCTCCTAAGGCTTGGAAACG = ZAT12 T-DNA	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ZnF T-DNA	CATAAACCTCTCGTTCACC	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ZnF WT-fw	GCATTGCCAAGACCTGATTGC	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ZnF WT-rev	CATAAACCTCTCGTTCACC = ZnF T-DNA	-	Analyse von Knockout-Pflanzen
ApoI-Adapter fw	CTC GTA GAC TGC GTA CC	-	cDNA-AFLP
ApoI-Adapter rev	phosph-TTA ACC ATG CGT CAG ATG	-	cDNA-AFLP
TaqI-Adapter fw	GAC GAT GAG TCC TGA C	-	cDNA-AFLP
TaqI-Adapter rev	phosph-GCC AGT CCT GAG TA	-	cDNA-AFLP
Apo0	CTCGTAGACTGCGTACCAATT	-	cDNA-AFLP
Apo3	CTCGTAGACTGCGTACCAATTAG	-	cDNA-AFLP
Apo5	CTCGTAGACTGCGTACCAATTTA	-	cDNA-AFLP
Apo6	CTCGTAGACTGCGTACCAATTTT	-	cDNA-AFLP
Apo7	CTCGTAGACTGCGTACCAATTTG	-	cDNA-AFLP
Taq0	GACGATGAGTCCT GACCGA	-	cDNA-AFLP
Taq1	GACGATGAGTCCTGACCGAAA	-	cDNA-AFLP
Taq2	GACGATGAGTCCTGACCGAAT	-	cDNA-AFLP
Taq3	GACGATGAGTCCTGACCGAAG	-	cDNA-AFLP
Taq4	GACGATGAGTCCTGACCGAAC	-	cDNA-AFLP
Taq5	GACGATGAGTCCTGACCGATA	-	cDNA-AFLP
Taq6	GACGATGAGTCCTGACCGATT	-	cDNA-AFLP
Taq7	GACGATGAGTCCTGACCGATG	-	cDNA-AFLP
Taq8	GACGATGAGTCCTGACCGATC	-	cDNA-AFLP
Taq9	GACGATGAGTCCTGACCGAGA	-	cDNA-AFLP
Taq10	GACGATGAGTCCTGACCGAGT	-	cDNA-AFLP
Taq11	GACGATGAGTCCTGACCGAGG	-	cDNA-AFLP
Taq12	GACGATGAGTCCTGACCGAGC	-	cDNA-AFLP
Taq13	GACGATGAGTCCTGACCGACA	-	cDNA-AFLP
Taq14	GACGATGAGTCCTGACCGACT	-	cDNA-AFLP
Taq15	GACGATGAGTCCTGACCGACG	-	cDNA-AFLP
Taq16	GACGATGAGTCCTGACCGACC	-	cDNA-AFLP
pYES2 ZIP9-AT lang fw	gcgcgccgcATGTCTCTCTTACAGGATTTTGGCAG	<i>Not</i> I	heterolge Expression in <i>S. cerevisiae</i> spezifische Amplifikation lange Version
pYES 2 ZIP9-AT kurz fw	gcgcgccgcATGGCGTCGATCCTTATCTCCG	<i>Not</i> I	heterolge Expression in <i>S. cerevisiae</i> Amplifikation kurze Version
pYES2 ZIP9-AT rev	gcgctcgagTCAAGCCCAAATTGCAAGAGCAG	<i>Xho</i> I	heterolge Expression in <i>S. cerevisiae</i> Amplifikation beider Versionen
pYES2 ZIP9-CH lang -fw	gcgcgccgcATGTCTCTCTTACAGGATTTCTGG	<i>Not</i> I	heterolge Expression in <i>S. cerevisiae</i> spezifische Amplifikation lange Version
pYES2 ZIP9-CH kurz -fw	gcgcgccgcATGGCGTCGATCCTCATCTCC	<i>Not</i> I	heterolge Expression in <i>S. cerevisiae</i> Amplifikation kurze Version
pYES2 ZIP9-CH -rev	gcgctcgagTCAAGTCCAAATAGCAAGAGCAGAC	<i>Xho</i> I	heterolge Expression in <i>S. cerevisiae</i> Amplifikation beider Versionen
5'-RACE-ZIP9	GATGAGGCAATGGCCGTTCCACGG	-	RACE-PCR
3'-RACE-ZIP9	GCCCATGCACCATACGTCTCTCC	-	RACE-PCR
RT s-hsp AT-fw	GGAAGTTCACGAGGAGGTTTAGGC	-	realtime-PCR
RT s-hsp AT-rev	GGCTTTGATTTCTCCATCTTAG	-	realtime-PCR
RT s-hsp CH-fw	GGAAGTTCACGAGGAGGTTAAGC	-	realtime-PCR
RT s-hsp CH-rev	GGCTTTGATTTCTCCATCTTAG	-	realtime-PCR
RT EREBP-fw	GTGGATGACGGCGAGTCTAG	-	realtime-PCR
RT EREBP-rev	CATCGAAGTAAACTGATCCACCG	-	realtime-PCR
RT BCBP-fw	GGAGGCATGATGTGGCAGTTG	-	realtime-PCR
RT BCBP AT-rev	TGTGGCTAATGGGTTTCTCTTCTC	-	realtime-PCR

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle	Bemerkung
RT BCBP CH-rev	TATGGCTGATGGGTTTCTCTTTCTC	-	realtime-PCR
RT RezKin-fw	CAGCGCAAACCGATGTGTATAGC	-	realtime-PCR
RT RezKin-rev	GCCTCCTTCCACACACTACC	-	realtime-PCR
NAS1-fw	CCACCAAGATTGCCTTCGTG	-	RT-PCR
NAS1-rev	AACATGCATCCACGAGTACC	-	RT-PCR
NAS2-fw	TATTAACGCTAAGGAGGGG	-	RT-PCR / Sonde
NAS2-rev	AATTCTTCTCCATACCACGA	-	RT-PCR / Sonde
NAS3-fw	GCTTAAAGAGCTTTGATGTC	-	RT-PCR
NAS3-rev	TTGAGCAAGCATGAATTAGG	-	RT-PCR
NAS4-fw	ATCAGCGAATATGGTAGCAG	-	RT-PCR
NAS4-rev	ACTCCTCGATAATGCTCTTC	-	RT-PCR
OAS-A1-fw	TAAAGAACAGAACGCAAACG	-	RT-PCR
OAS-A1-rev	GGCGTCTCTAAGAAGAAATGG	-	RT-PCR
OAS-A2-fw	TGCTGGTTTTATTCCAGGCA	-	RT-PCR
OAS-A2-rev	AAAGGGGAACAGATTCAGGG	-	RT-PCR
ZIP4-fw	AGTCACTCTAATAGTCATGG	-	RT-PCR
ZIP4-rev	GCCTCAAATTACAACATCACC	-	RT-PCR
ZIP9-fw	CGCTTGGAGTATCACATAGCC	-	RT-PCR
ZIP9-rev	CAGCGATCAAATCCACAAGC	-	RT-PCR
Nramp3-fw	ATTCATCGGAAGCTACACTC	-	RT-PCR
Nramp3-rev	GTGAAAGTGATGCCACGAGC	-	RT-PCR
CYP5-fw	TAGAGATCGACGGCAAATCC	-	RT-PCR
CYP5-rev	CATTCCTTGCACTTCTTCC	-	RT-PCR
EF1 α -fw	CAACCTTGACTGGTACAAGG	-	RT-PCR
EF1 α -rev	AGAACGCCTGTCAATCTTGG	-	RT-PCR
β -Tubulin-fw	GCTTACGAATCCGAGGGTGCC	-	RT-PCR
β -Tubulin-rev	GTCCAGTGTCTGTGATATTGCACC	-	RT-PCR
Calmo-fw	AGCTGCGTTAGTCTCTTAGG	-	RT-PCR
Calmo-rev	CAAAGCTGAGAACTCCATCG	-	RT-PCR
putCal-fw	AAGAACAGAGAGTTAGAGGC	-	RT-PCR
putCal-rev	TTAGCGCATCATAAGAGC	-	RT-PCR
RAS-fw	GGTGTAGCCTTTTACCGTGG	-	RT-PCR
RAS-rev	GCATTCACACCCTGTAGACC	-	RT-PCR
RezKin1-fw	GCAAAGCCTCGACAAGCTCG	-	RT-PCR
RezKin1-rev	GTTCCGATGAGGTGTGTTGG	-	RT-PCR
HBPI-fw	CGGTGGATTCGTTTCATCCG	-	RT-PCR
HBPI-rev	AGCCATAAGGAGCTTAGAGC	-	RT-PCR
WRKY11-fw	GAGATGTCTCGAGCATGAGC	-	RT-PCR
WRKY11-rev	AATATTCCTGCATCGCGG	-	RT-PCR
WRKY18-fw	CATCATCAGCAACATGAGC	-	RT-PCR
WRKY18-rev	TGTGCTTGACCCACCCTGGC	-	RT-PCR

Anhang B: spezielle PCR-Programme

Tabelle 30: PCR-Programm „Präamplifikation“

1x	94 °C	2 min 30 s
20x	94 °C	30 s
	52 °C	30 s
	72 °C	60 s
1x	4 °C	für immer

Tabelle 31: PCR-Programm „selektive Amplifikation“

1x	94 °C	2 min 30 s
13x	94 °C	30 s
	65 ^x °C	30 s
	72 °C	60 s
23x	94 °C	30 s
	56 °C	30 s
	72 °C	60 s
1x	72 °C	7 min
1x	4 °C	für immer

^x pro Zyklus um 0,7°C reduziert

Anhang C: cDNA-AFLP-Klonliste

Tabelle 32: Zusammenstellung aller cDNA-AFLP Klone

Klon	Länge (bp)	BlastN (bp/bp)	AGI-Code	Protein	Organismus	Kategorie	EST	
105	-1	137	81/82	At2g13560	Malat Oxidoreduktase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-2	137	118/133	At1g35710	putative LRR-Rezeptor-Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	1
	-3	162	143/154	At4g31550	WRKY11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	18
107	-1	146	137/142	At4g36500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
	-2	140	129/140	At1g70690	Kinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	140	129/140	At1g70690	Kinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	140	129/140	At1g70690	Kinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
108	-1	164	140/145	At4g36500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
	-2	146	136/142	At4g36500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
	-4	146	137/142	At4g36500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
113	-1	29	21/21		nicht codierende Sequenz	<i>Mus musculus</i>	-	
	-2	29	21/21		nicht codierende Sequenz	<i>Mus musculus</i>	-	
	-3	29	18/18		serine/threonine kinase 39	<i>Mus musculus</i>	-	
114	-1	167	140/153	At1g72890	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-2	207	141/153	At1g72890	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	167	140/153	At1g72890	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	167	140/153	At1g72890	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
115	-1	113	110/113	At3g13870	Wurzelhaardefektprotein 3 (RHD3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-2	113	110/113	At3g13870	Wurzelhaardefektprotein 3 (RHD3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-3	113	111/112	At4g33050	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
118	-1	143	133/144	At3g52380	chloroplastidäres RNA-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	836
	-2	141	87/98	At2g14690	1,4-Beta-Xylan Endohydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	148	140/145	At3g09210	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-4	142	134/144	At3g52380	chloroplastidäres RNA-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	836
122	-1	173	145/153	At5g45280	putative Pektinacetylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-2	140	87/98		nicht-codierende Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	
	-3	173	162/170	At5g45490	ähnlich zu Krankheitsresistenzprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-4	173	144/153	At5g45280	putative Pektinacetylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
123	-1	179	158/161	At2g07725	putatives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mitochondriales protein	-
	-2	162	158/161	At2g07725	putatives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mitochondriales protein	-
	-3	179	158/161	At2g07725	putatives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mitochondriales protein	-
	-4	179	158/161	At2g07725	putatives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mitochondriales protein	-
124	-1	141	110/134	At3g19960	putatives Myosin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
	-2	149	126/141	At1g43900	putative Proteinphosphatase 2C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	143	56/65	At1g75940	Glycosyl Hydrolase (ATA27)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	141	130/136	At1g50360	putatives Myosin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
129	-1	36	35/36	At3g50830	Stressinduziertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Stressantwort	13
	-2	86	52/56		nicht-codierende Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	77	67/77	At3g54500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	8
	-4	77	48/50	At1g42960	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	8
130	-1	160	112/121	At1g60710	Protein der Aldo-/Keto-Reduktase Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	20
	-2	125	114/124	At4g04610	5'-Adenylylsulfat Reduktase (APR1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	11
	-3	125	114/124	At4g04610	5'-Adenylylsulfat Reduktase (APR1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	11
	-4	125	114/124	At4g04610	5'-Adenylylsulfat Reduktase (APR1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	11
136	-1	90	65/73		nicht-codierende Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-2	85	83/83	At5g42380	Calmodulin-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-3	90	81/87	At4g01870	tolB-verwandtes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	9
138	-1	60	44/45	At4g24160	Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
	-2	43	42/43	At4g24160	Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
	-3	42	41/42	At4g24160	Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
	-4	43	39/40	At4g24160	Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
139	-1	317	308/316	At1g52400	putative Beta-Glucosidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	46
	-2	335	300/317	At1g52400	putative Beta-Glucosidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	46
	-4	322	306/318	At1g52400	putative Beta-Glucosidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	46
146	-1	102	59/66	At5g48380	LRR-Proteinkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	3
	-2	86	62/71	At5g48380	LRR-Proteinkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	3
	-3	86	61/71	At5g48380	LRR-Proteinkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	3
166	-1	185	116/117	At3g60420	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-2	233	136/137	At3g08530	clathrin heavy chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	20
	-4	215	133/137	At3g08530	clathrin heavy chain	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	20
167	-2	218	189/191	At3g60420	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	217	188/191	At3g60420	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	217	189/191	At3g60420	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
168	-3	87	38/43		nicht-codierende Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	55	38/43		nicht-codierende Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-

Klon	Länge (bp)	BlastN (bp/bp)	AGI-Code	Protein	Organismus	Kategorie	EST
169	-1	87	38/43	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-2	87	38/43	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	104	38/43	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
170	-2	66	60/63	At5g39570 unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	17
172	-2	208	135/145	At1g02400 unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	206	130/140	At1g52430 Ubiquitin-Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
173	-1	147	140/149	At2g46830 MYB-verwandter Transkriptionsfaktor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	5
	-2	147	140/149	At2g46830 MYB-verwandter Transkriptionsfaktor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	5
	-3	147	140/149	At2g46830 MYB-verwandter Transkriptionsfaktor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	5
174	-1	136	121/134	At1g76650 Calmodulin ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-2	136	120/133	At1g76650 Calmodulin ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-3	136	122/133	At1g76650 Calmodulin ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
175	-1	112	56/56	At5g38410 RuBisCO (kleine Untereinheit)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Photosynthese	313
	-2	113	101/105	At1g24100 Glykosyl Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
	-3	113	101/105	At1g24100 Glykosyl Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
176	-2	276	122/131	At5g06950 bZip-Transkriptionsfaktor (HBPI-ähnlich)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	251	89/93	At3g12670 putative CTP-Synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
177	-1	147	117/117	At3g60420 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-2	239	162/173	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	270	45/51	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
178	-1	184	115/117	At3g60420 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-2	183	112/115	At3g60420 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	199	103/111	At3g13110 Serin-O-Acetyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cysteinbiosynthese	12
179	-2	111	97/109	At1g01300 Aspartyl-Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
	-3	73	70/73	At1g01300 Aspartyl-Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
180	-1	140	60/64	At3g09940 putative Monodehydroascorbat-Reduktase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	8
	-2	116	83/92	At1g01300 Aspartyl-Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	11
181	-1	310	144/170	At3g07390 Auxin induziertes Protein (AIR12)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	13
	-2	312	172/183	At3g07130 Ser/Thr-Protein Phosphatase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	295	151/170	At3g07390 Auxin induziertes Protein (AIR12)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	13
182	-1	112	93/97	At2g36780 putative Glukosyl-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-2	109	101/107	At5g09440 putatives Phosphat responsives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	29
	-3	109	101/107	At5g09440 putatives Phosphat responsives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	29
183	-2	56	55/55	At5g25460 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	30
	-3	56	55/55	At5g25460 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	30
	-4	56	55/55	At5g25460 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	30
184	-1	238	82/87	At1g52720 unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-2	228	66/67	At1g08930 ERD6 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-3	238	214/237	At4g17230 scarecrow-like 13 (SCL13)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	5
	-4	231	114/117	At1g72520 putative lipoxigenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	10
185	-1	185	95/99	At3g04680 pre-mRNA Spaltkomplexprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-2	171	89/89	At4g16150 calmodulinbindender Transkriptionsaktivator	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	2
	-3	142	97/102	At1g43670 putative 1,6-Bisphosphatase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Photosynthese	13
	-4	191	129/141	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
186	-1	133	130/131	At1g21920 phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
	-2	133	130/131	At1g21920 phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
	-3	153	82/87	At1g52720 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
	-4	153	82/87	At1g52720 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	6
187	-3	52	30/31	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
188	-1	52	29/32	At4g31730 exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-2	73	19/19	At1g53990 GDSL-Motiv Lipase/Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-3	86	35/36	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	52	32/33	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
189	-1	179	153/165	At2g04842 threonyl-tRNA Synthetase verwandtes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	81	18/18	nicht-codierender Sequenz	<i>Mus musculus</i>	-	-
	-4	213	102/107	At1g29910 Chlorophyll a/b-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	105
190	-1	136	121/130	At3g46000 aktin depolymerisierender faktor 2 (ADF2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	zelluläre Organisation	5
	-2	63	49/51	At1g03475 coproporphyrinogen III oxidase (LIN2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	9
	-3	241	124/129	At3g46000 aktin depolymerisierender faktor 2 (ADF2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	zelluläre Organisation	5
	-4	135	80/90	At4g11260 Sgt 1 (Phosphatase) verwandtes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	15
191	-1	122	61/63	At4g26970 putative Aconitase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	24
	-2	122	61/63	At4g26970 putative Aconitase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	24
	-4	138	64/66	At4g26970 putative Aconitase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	24
192	-1	104	64/64	At4g31800 WRKY18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	-
	-2	117	101/117	unbekanntes Protein	<i>Oryza sativa</i>	-	-
	-3	48	28/30	nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	104	64/64	At4g31800 WRKY 18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	-
193	-1	104	64/64	At4g31800 WRKY 18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	-

Klon	Länge (bp)	BlastN (bp/bp)	AGI-Code	Protein	Organismus	Kategorie	EST	
	-2	104	64/64	At4g31800	<i>WRKY18</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	-
194	-1	87	38/43	At2g41100	<i>TCH3</i> (calmodulin-ähnliches Protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
	-2	87	18/18	At2g41100	<i>TCH3</i> (calmodulin-ähnliches Protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
	-3	133	42/45		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
	-4	87	38/43	At2g41100	<i>TCH3</i> (calmodulin-ähnliches Protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
195	-1	87	36/42	At2g41100	<i>TCH3</i> (calmodulin-ähnliches Protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	7
	-2	330	144/170	At3g07390	auxin-induced protein (AIR12)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	13
	-3	194	26/26		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
	-4	74	21/21		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
196	-2	91	67/69	At2g15220	putatives sekretorisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	74	71/74	At5g38600	Splicosom assoziiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-4	71	42/43	At5g67450	Cys2/His2 Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
197	-1	328	150/169	At3g07390	auxin-induced protein (AIR12)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	13
	-3	133	42/45		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
	-4	78	51/56	At2g15220	hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
198	-1	65	42/43	At5g67450	Cys2/His2 -type Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-2	69	42/43	At5g67450	Cys2/His2 -type Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-3	65	42/43	At5g67450	Cys2/His2 -type Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-4	82	41/43	At5g67450	Cys2/His2 -type Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
200	-3	82	42/43	At5g67450	Cys2/His2 -type Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-4	65		At5g67450	Cys2/His2 -type Zinkfinger Protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
202	-2	127	101/109	At2g36780	putative Glykosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-3	127	101/109	At2g36780	putative Glykosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
203	-1	162	102/104	At2g36780	putative glucosyl transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-2	137	54/55	At3g18820	putatives GTP-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
	-3	94	89/93	At3g18820	putatives GTP-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
	-4	110	103/109	At2g36780	putative glucosyl transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
204	-1	50	45/47	At5g15740	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-2	115	30/30		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
	-3	53	49/52	At1g55805	BolA ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	54	47/53	At4g23890	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	10
205	-1	102	60/60	At4g31800	<i>WRKY18</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	-
	-2	104	64/64	At4g31800	<i>WRKY18</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	-
	-3	149	102/119		unbekanntes Protein	<i>Oryza sativa</i>	-	-
	-4	102	60/60	At4g31800	<i>WRKY18</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	-
207	-1	139	51/55	At2g32190	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-2	115	29/30		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
	-3	135	121/138	At5g52390	Photoassimilat responsives Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-4	173	164/170	At1g76680	12-oxophytodienoat reduktase (OPR1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	29
208	-1	140	116/119	At4g02230	putatives ribosomales Protein L19	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteinsynthese	13
	-2	126	116/123	At3g18820	putatives GTP-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
	-4	126	116/123	At3g18820	putatives GTP-bindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
209	-1	95	67/76	At1g62480	vakuoläres calziumbindendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	67
	-2	110	90/92	At1g21270	zellwandassoziierte Kinase 2 (WAK2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-3	94	87/89	At1g21270	zellwandassoziierte Kinase 2 (WAK2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-4	126	87/89	At1g21270	zellwandassoziierte Kinase 2 (WAK2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
211	-1	97	74/79	At3g11910	putative ubiquitin-spezifische Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
	-3	92	32/32	At1g01680	U-Box enthaltendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	80	28/29		putatives Beta-Familie G-Protein	<i>Musa acuminata</i>	-	-
212	-1	119	74/78	At3g11910	putative ubiquitin-spezifische Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
	-2	127	74/78	At3g11910	putative ubiquitin-spezifische Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	15
	-3	97	79/83	At3g43190	putative Saccharose Synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	4
213	-1	79	55/56	At5g46295	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-3	153	54/57	At1g69530	Expansin ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	10
	-4	73	56/58	At1g12380	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
215	-1	174	164/173	At1g44170	putative Aldehyddehydrogenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-2	128	123/129	At3g62580	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-3	170	22/22		nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	144	22/22		nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
216	-1	69	40/44	At3g14075	Protein der Klasse 3-Lipasen Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-2	65	19/19		nicht-codierender Sequenz	<i>Caenorhabditis elegans</i>	-	-
	-4	69	40/44	At3g14075	Protein der Klasse 3-Lipasen Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
217	-1	475	279/292	At1g14200	C3HC4-typ Zinkfinger Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-2	412	276/292	At1g14200	C3HC4-typ Zinkfinger Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-3	401	377/399	At2g03760	putative Steroid Sulfotransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-4	401	379/399	At2g03760	putative Steroid Sulfotransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
218	-2	149	69/70	At2g46330	Arabinogalactan Protein (AGP 16)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	19
219	-1	155	72/76	At1g17170	putative Glutathion-S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-2	155	72/76	At1g17170	putative Glutathion-S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-3	155	72/76	At1g17170	putative Glutathion-S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-4	155	72/76	At1g17170	putative Glutathion-S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1

Klon	Länge (bp)	BlastN (bp/bp)	AGI-Code	Protein	Organismus	Kategorie	EST	
220	-1	498	455/485	At5g16120	putative Lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	3
	-2	486	448/470	At3g11510	40S ribosomales Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
	-3	486	459/483	At5g16120	putative Lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	3
	-4	488	458/483	At5g16120	putative Lipase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Metabolismus	3
221	-1	221	108/111	At1g74450	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-3	221	108/111	At1g74450	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-4	237	107/111	At1g74450	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
224	-1	126	119/124	At3g54090	Fruktosekinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-2	126	119/124	At3g54090	Fruktosekinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-3	126	119/124	At3g54090	Fruktosekinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-4	126	119/124	At3g54090	Fruktosekinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
225	-1	114	108/111	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
	-2	114	108/111	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
	-3	114	108/111	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
	-4	114	108/111	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
226	-1	77	29/31	At5g56660	Aminosäure Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Katabolismus	2
	-2	77	29/31	At5g56660	Aminosäure Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Katabolismus	2
227	-1	114	108/111	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
	-2	114	108/111	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
	-3	130	111/114	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
	-4	114	111/114	At4g01690	Protoporphyrinogen Oxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sekundärmetabolismus	11
230	-1	124	114/119	At4g11320	Zysteinproteinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteolyse	23
	-2	124	114/119	At4g11320	Zysteinproteinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteolyse	23
	-3	124	114/119	At4g11320	Zysteinproteinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteolyse	23
	-4	124	114/119	At4g11320	Zysteinproteinase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteolyse	23
231	-1	229	141/147	At3g44720	putative chloroplastidäre Prephenatdehydratase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	14
	-2	162	87/88	At2g41110	Calmodulin 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	12
	-3	162	87/88	At2g41110	Calmodulin 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	12
	-4	120	107/113	At5g48380	LRR-Proteinkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	3
232a	-1	392	369/377	At1g80900	magnesium transporter (MGT1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transport	2
	-2	391	364/375	At1g80900	magnesium transporter (MGT1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transport	2
	-3	350	305/339	At1g09730	Protease	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	264	28/29	At2g39760	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
232b	-1	271	218/233	At5g40900	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	264	28/29	At2g39760	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-4	264	28/29	At2g39760	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
233a	-1	174	138/144	At4g39200	ribosomales Protein S25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteinbiosynthese	44
	-2	174	138/144	At4g39200	ribosomales Protein S25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteinbiosynthese	44
	-3	277	238/261	At1g08080	putatives Speicherprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-4	367	205/216	At1g08080	putatives Speicherprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
233b	-1	202	120/129	At4g24940	Ubiquitin aktivierendes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Proteolyse	4
	-2	207	188/203	At2g38430	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-3	189	136/140	At2g41120	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
234a	-1	249	240/249	At1g08080	putatives Speicherprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-2	249	240/249	At1g08080	putatives Speicherprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-3	249	239/249	At1g08080	putatives Speicherprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-4	249	240/249	At1g08080	putatives Speicherprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
234b	-1	135	132/135	At2g03240	Protein der EXS Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-2	134	130/134	At4g38470	Proteinkinase ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-3	135	133/135	At2g03240	Protein der EXS Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-4	135	131/135	At2g03240	Protein der EXS Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
235	-1	264	149/154	At5g22330	RUV DNA-Helikase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	3
	-2	265	149/154	At5g22330	RUV DNA-Helikase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	3
	-4	265	149/154	At5g22330	RUV DNA-Helikase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	3
236	-1	87	83/87	At5g04720	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-2	87	83/87	At5g04720	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-3	88	83/88	At5g04720	putatives Krankheitsresistenz P rotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
	-4	104	85/90	At5g04720	putatives Krankheitsresistenz Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	5
237	-1	37	32/33	At1g10850	putative Rezeptorkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	1
	-2	37	32/33	At1g10850	putative Rezeptorkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	1
	-3	37	32/33	At1g10850	putative Rezeptorkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	1
	-4	37	32/33	At1g10850	putative Rezeptorkinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	1
238	-1	59	45/46		nicht-codierender Sequenz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-2	59	57/59	At2g44500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-3	61	58/61	At4g37090	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-4	59	57/59	At2g44500	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
239	-1	71	35/37	At4g17490	EREBP-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	7
	-2	71	35/37	At4g17490	EREBP-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	7
	-4	71	35/37	At4g17490	EREBP-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transkriptionskontrolle	7
241	-1	184	182/183	At3g60420	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3

Klon	Länge (bp)	BlastN (bp/bp)	AGI-Code	Protein	Organismus	Kategorie	EST	
	-2	80	66/70	At1g45145	Thioredoxin (H-Typ 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	82	77/86	At1g02380	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
	-4	82	77/86	At1g02380	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	2
242	-1	231	132/132		chloroplastidäre genomische DNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-2	221	107/110	At1g74450	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
243	-1	32	24/25	At4g34390	Extra großes G-Protein ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-2	32	24/25	At4g34390	Extra großes G-Protein ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-3	32	24/25	At4g34390	Extra großes G-Protein ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
	-4	32	24/25	At4g34390	Extra großes G-Protein ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	4
244	-1	80	66/71	At1g45145	Thioredoxin (H-Typ 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-2	80	67/71	At1g45145	Thioredoxin (H-Typ 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-3	80	67/71	At1g45145	Thioredoxin (H-Typ 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
	-4	80	67/71	At1g45145	Thioredoxin (H-Typ 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-
245	-1	96	78/86	At2g38540	putatives, nichtspezifisches Lipidtransferprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	137
	-2	106	104/105	At1g08200	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	20
	-3	200	42/49	At2g38540	putatives, nichtspezifisches Lipidtransferprotein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	137
247	-1	54	31/34	At5g66850	MAP-Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	4
	-2	54	31/34	At5g66850	MAP-Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	4
	-3	54	31/34	At5g66850	MAP-Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Signaltransduktion	4
248	-1	141	132/138	At5g14700	cinnamoyl-CoA-Reduktase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polysaccharidbiosynthese	1
	-2	141	132/138	At5g14700	cinnamoyl-CoA-Reduktase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polysaccharidbiosynthese	1
	-3	141	132/138	At5g14700	cinnamoyl-CoA-Reduktase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polysaccharidbiosynthese	1
	-4	141	132/138	At5g14700	cinnamoyl-CoA-Reduktase-ähnliches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polysaccharidbiosynthese	1
259	-1	85	83/85	At4g03550	Glykosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-2	85	83/85	At4g03550	Glykosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-3	85	82/85	At4g03550	Glykosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
	-4	85	83/85	At4g03550	Glykosyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kohlenstoffmetabolismus	3
264	-1	184	182/183	At3g60420	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	3
	-2	221	108/111	At1g74450	exprimiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	1
	-4	179	162/169	At5g19390	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-

Anhang D: zusätzliche Microarray-Listen

Tabelle 33: Sondensätze, die in *A. thaliana* bei Cu als induziert eingestuft wurden.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I9178_at	At5g20230	plastocyanin-like domain containing protein	503,71
20489_at	At2g44840	ethylene response element binding protein (EREBP), putative	165,86
I8508_s_at	At2g02010	glutamate decarboxylase	164,13
I9640_at	At2g29460	glutathione transferase, putative	148,36
I2396_at	At1g70130	receptor lectin kinase, putative	112,17
I6082_s_at	At2g29450	glutathione transferase (103-1A)	109,45
I8668_at	At1g17420	lipoxygenase (LOX), putative	87,35
I7008_at	At2g24850	aminotransferase, putative	84,66
I8267_at	At2g32210	expressed protein	76,72
I5647_s_at	At4g14680	ATP-sulfurylase	75,78
I6272_at	At2g14290	F-box protein family	63,40
I8258_s_at	At2g18210	expressed protein	63,31
I6620_s_at	At5g57560	xyloglucan endotransglycosylase (TCH4)	62,35
I2916_s_at	At1g19670	coronatine-induced protein 1 (COR11)	57,85
I2251_at	At2g34930	disease resistance protein family	52,45
I5424_at	At3g50930	AAA-type ATPase family	51,33
I6638_s_at	At3g28210	zinc finger protein (PMZ) -related	50,00
I2892_g_at	At4g11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 (ACC synthase 6)	49,92
I7533_s_at	At4g25810	xyloglucan endotransglycosylase (XTR6)	48,13
I4320_at	At2g42360	RING zinc finger protein -related	48,08
I9991_at	At2g35980	harpin-induced protein 1 family (HIN1)	47,71
I2737_f_at	At3g23250	myb family transcription factor (MYB15)	46,77
I7514_s_at	At3g23240	ethylene response factor 1 (ERF1)	46,12
I8228_at	At3g15356	lectin -related	43,40
I7381_at	At4g36500	expressed protein	41,69
I2891_at	At4g11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 (ACC synthase 6)	40,99
I5779_g_at	At3g46090	zinc finger protein ZAT7	40,90
I3435_at	At4g06746	AP2 domain transcription factor family	38,64
I9108_at	At4g34410	AP2 domain transcription factor, putative	37,50
I3015_s_at	At5g59820	zinc finger protein Zat12	37,04
I2356_at	At5g06720	peroxidase, putative	35,64
I4032_at	At4g37370	cytochrome P450, putative	34,77
I6539_s_at	At4g17490	ethylene responsive element binding factor (ERF6)	33,69
I3842_at	At1g24140	metallo proteinase -related	33,41
I9742_at	At1g04370	ethylene response factor, putative	31,94
I6817_s_at	At4g11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 (ACC synthase 6)	31,11
I5778_at	At3g46090	zinc finger protein ZAT7	30,82
I9633_at	At1g14040	hypothetical protein	30,68
I4116_at	At5g26340	hexose transporter, putative	30,42
I8217_g_at	At1g27730	salt-tolerance zinc finger protein	29,13
I8963_at	At2g29440	glutathione transferase, putative	28,79
I6763_at	At4g25380	hypothetical protein	28,63
I9383_at	At2g01340	expressed protein	28,62
I7653_at	At4g39030	enhanced disease susceptibility 5 (Eds5)	28,45
I8591_at	At5g08790	No apical meristem (NAM) protein family	28,08
I2712_f_at	At1g18570	myb family transcription factor	27,09
20246_s_at	At4g23250	protein kinase-like protein	26,81
I3312_at	At2g32140	disease resistance protein (TIR class)	24,70
20619_at	At2g37430	C2H2-type zinc finger protein -related	24,52
I8946_at	At5g39580	peroxidase, putative	24,05
I4854_at	At2g44580	C3HC4-type zinc finger protein family	23,66
I8121_s_at	At2g47190	MYB transcription factor (Atmyb2)	23,63
I3274_s_at	At1g74310	heat shock protein 101 (HSP101)	23,17
I8253_s_at	At1g76680	12-oxophytodiene reductase (OPR1)	22,94
I8669_at	At4g17090	glycosyl hydrolase family 14 (beta-amylase)	22,57
20144_at	At4g25390	protein kinase family	21,92
I6440_s_at	At2g40000	nematode-resistance protein -related	21,92
I2790_s_at	At4g22690	cytochrome P450 family	21,37
I7075_s_at	At5g22300	Nitrilase 4	20,90
I9451_at	At1g61820	glycosyl hydrolase family 1	20,30
I9843_at	At1g61890	MATE efflux protein family	20,23
I6130_s_at	At4g11370	RING-H2 finger protein, putative	19,44
I3279_s_at	At5g12020	class II heat shock protein	19,23
I4924_at	At2g28400	expressed protein	18,87
I3834_at	At4g01010	cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC13)	18,70
I6712_at	At2g35710	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin) - related	18,65
I2256_at	At2g24130	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	18,60

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I5522_i_at	At4g24370	expressed protein	18,56
I7303_s_at	At2g38470	WRKY family transcription factor	18,47
I5389_at	At2g22860	(AtPSK) phyto-sulfokine precursor 2	18,28
I6916_s_at	At5g02490	heat shock protein hsc70-2	17,52
I20620_g_at	At2g37430	C2H2-type zinc finger protein -related	17,44
I2816_at	At1g78830	curculin-like (mannose-binding) lectin family	17,39
I9970_s_at	At2g39650	expressed protein	17,34
I9883_at	At4g22590	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	17,31
I9803_s_at	At2g22760	bHLH protein	16,86
I4608_at	At1g13210	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	16,81
I3255_i_at	At4g39640	gamma-glutamyltransferase -related	16,79
I6609_s_at	At5g47220	ethylene responsive element binding factor 2 (EREBP -2)	16,70
I8216_at	At1g27730	salt-tolerance zinc finger protein	16,69
I9591_at	At1g44350	gr1 protein	16,60
I2817_g_at	At1g78830	curculin-like (mannose-binding) lectin family	16,39
I8556_at	At2g21130	cyclophilin (CYP2)	16,20
I3215_s_at	At1g67980	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	15,99
I4461_at	At2g28210	carbonic anhydrase -related	15,60
I2880_s_at	At3g28930	AIG2-related protein	15,49
I20190_at	At2g16660	nodulin-related protein	15,38
I5431_at	At4g27280	calcium-binding EF-hand family protein	15,32
I7047_s_at	At4g35480	RING-H2 finger protein RHA3b	15,25
I3789_at	At1g30040	gibberellin 2-oxidase (GA2-oxidase)	14,93
I6747_at	At4g18170	WRKY family transcription factor	14,82
I3275_f_at	At3g46230	class I heat shock protein(HSP 17.4)	14,73
I6063_s_at	At4g17500	ethylene responsive element binding factor 1 (frameshift !)	14,63
I3115_at	At1g62300	WRKY family transcription factor	14,21
I3276_s_at	At1g53540	17.6 kDa heat shock protein (AA 1-156)	14,20
I5404_at	At1g54050	heat shock hsp20 protein family	13,78
I4030_at	At2g05940	protein kinase, putative	13,73
I6255_at	At2g44070	translation initiation factor eIF-2B delta subunit-related	13,64
I4711_s_at	At2g40140	CCCH-type zinc finger protein -related	13,44
I5341_at	At2g32200	hypothetical protein	13,10
I5523_s_at	At4g24370	expressed protein	13,07
I2431_at	At2g26150	heat shock transcription factor family	13,07
I5582_s_at	At3g22370	alternative oxidase 1a, mitochondrial (AOX1A)	12,80
I3627_at	At4g23700	cation/hydrogen exchanger, putative (CHX17)	12,68
I6465_at	At5g02490	heat shock protein hsc70-2	12,63
I7111_s_at	At1g01480	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 (ACC synthase 2)	12,31
I20323_at	At2g29500	small heat shock protein -related	12,24
I4882_at	At4g39670	expressed protein	12,20
I4502_at	At4g39580	Kelch repeat containing F-box protein family	12,08
I3247_f_at	At3g11170	omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor (FAD7)	12,07
I2325_at	At4g38420	pectinesterase (pectin methyl-esterase), putative	12,05
I9182_at	At4g33050	expressed protein	12,02
I7379_at	At2g40140	CCCH-type zinc finger protein -related	11,99
I4083_at	At2g41380	embryo-abundant protein -related	11,88
I8680_s_at	At3g11170	omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor (FAD7)	11,85
I9762_at	At4g21680	peptide transporter - like protein	11,85
I9263_at	At2g30020	protein phosphatase 2C (PP2C), putative	11,76
I8670_g_at	At4g17090	glycosyl hydrolase family 14 (beta-amylase)	11,75
I3256_s_at	At4g39640	gamma-glutamyltransferase -related	11,72
I9460_s_at	At1g09940	glutamyl-tRNA reductase 2 (GluTR) (HEMA2)	11,56
I8126_s_at	At4g28350	receptor protein kinase like protein	11,45
I5665_s_at	At5g04340	c2h2 zinc finger transcription factor -related	11,38
I6232_s_at	At2g05050	pseudogene, protein phosphatase 2C	11,18
I4631_s_at	At3g47380	pectinesterase - related	11,08
I6716_at	At2g21120	expressed protein	11,07
I7105_s_at	At5g47910	respiratory burst oxidase protein D (NADPH oxidase)	11,05
I7157_at	At2g02340	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	10,90
I7600_s_at	At5g42650	allene oxide synthase / cytochrome P450 74A	10,88
I5641_s_at	At4g18010	inositol polyphosphate 5-phosphatase II (IP5PII)	10,87
I3539_i_at	At3g47380	pectinesterase - related	10,76
I7119_s_at	At2g06050	12-oxophytodienoate reductase (OPR3)(DDE1)	10,67
I8224_s_at	At4g21830	expressed protein	10,66
I8662_s_at	At4g24160	hydrolase, alpha/beta fold family	10,66
I5531_i_at	At4g24340	expressed protein	10,63
I8012_s_at	At4g18010	inositol polyphosphate 5-phosphatase II (IP5PII)	10,57
I20372_at	At4g18200	purine permease family	10,38
I5438_at	At4g22610	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	10,28
I2698_at	At1g08920	sugar transporter, putative	10,26
I7300_at	At4g30210	NADPH-ferrihemoprotein reductase	10,12

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I6398_s_at	At4g21390	serine/threonine kinase - like protein	10,08
I3900_s_at	At3g47380	pectinesterase - related	10,01
I4358_s_at	At4g16820	lipase (class 3) family	9,94
I8631_at	At2g41640	expressed protein	9,77
I2539_s_at	At4g39640	gamma-glutamyltransferase -related	9,60
I3296_s_at	At3g15540	auxin-responsive protein IAA19	9,58
I2626_at	At2g20900	diacylglycerol kinase -related	9,50
I6807_at	At2g34650	protein kinase (PINOID/PID)	9,41
20051_at	At1g08940	expressed protein	9,38
I3135_s_at	At4g28400	protein phosphatase 2C (PP2C), putative	9,38
I5196_s_at	At4g04610	5'-adenylylsulfate reductase	9,20
I4070_at	At3g47960	peptide transporter -related	9,20
I3920_at	At1g23710	expressed protein	9,20
I4980_at	At2g03240	expressed protein	9,09
20291_s_at	At5g05730	anthranilate synthase, alpha subunit, component I-1 (ASA1)	8,99
I8300_at	At5g37770	calmodulin-related protein 2, touch-induced (TCH2)	8,95
I8003_at	At1g72930	disease resistance protein (TIR class), putative	8,86
I8945_at	At1g59860	heat shock protein, putative	8,78
I4966_at	At2g45450	expressed protein	8,72
I6573_s_at	At3g11170	omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor (FAD7)	8,69
I6553_f_at	At4g11360	RING-H2 finger protein RHA1b	8,67
I8284_at	At4g34150	C2 domain-containing protein	8,65
I7936_s_at	At4g17090	glycosyl hydrolase family 14 (beta-amylase)	8,57
I9468_at	At3g59750	receptor lectin kinase, putative	8,55
I6363_at	At1g61370	receptor protein kinase (IRK1) -related	8,51
20017_at	At2g44290	lipid transfer protein family	8,46
I3908_s_at	At4g20860	FAD-linked oxidoreductase family	8,46
I8132_s_at	At4g15100	serine carboxypeptidase -related	8,43
I5680_s_at	At3g08720	ribosomal-protein S6 kinase (ATPK19) -related	8,41
I7535_s_at	At4g02195	syntaxin of plants SYP42 (TLG2b)	8,39
I3270_at	At4g18880	heat shock transcription factor 21	8,37
I2335_at	At2g47060	serine/threonine protein kinase, putative	8,35
I4918_at	At2g32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family	8,34
20335_s_at	At3g50060	myb DNA-binding protein (MYB77)	8,34
I7392_s_at	At3g53260	phenylalanine ammonia-lyase (PAL2)	8,30
20142_at	At4g34390	extra-large G-protein - like	8,16
I5203_s_at	At1g68840	AP2 domain protein RAP2.8 (RAV2)	8,13
I8885_at	At2g36220	expressed protein	8,12
I2851_s_at	At1g01480	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 (ACC synthase 2)	7,99
I3617_at	At2g22500	mitochondrial carrier protein family	7,97
I4614_at	At2g30140	glycosyltransferase family	7,92
I8298_at	At4g26200	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACC synthase), putative	7,76
I4744_at	At1g59910	formin homology 2 (FH2) domain-containing protein	7,74
I3361_at	At1g70170	matrix metallo proteinase -related	7,72
I7207_at	At4g36670	mannitol transporter, putative	7,70
20537_at	At4g13340	leucine-rich repeat extensin family	7,70
I8276_at	At1g03600	photosystem II protein family	7,70
I9284_at	At2g38240	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	7,70
I3059_at	At4g36550	expressed protein	7,68
I6668_at	At4g11350	fringe-related protein	7,64
I4763_at	At3g09010	protein kinase family	7,63
I8378_at	At1g61260	cotton fiber expressed protein -related	7,53
I3538_at	At4g20780	calcium-binding protein, putative	7,53
I6344_at	At1g61550	S-locus protein kinase, putative	7,49
I8167_s_at	At4g18880	heat shock transcription factor 21	7,49
20247_at	At1g61810	glycosyl hydrolase family 1	7,44
I2475_at	At5g06730	peroxidase, putative	7,43
I7134_at	At1g08860	copine, putative	7,40
I2463_at	At4g29690	nucleotide pyrophosphatase - like protein	7,38
I2278_at	At4g23190	serine/threonine kinase - like protein	7,34
I7341_at	At4g18250	receptor serine/threonine kinase-related protein	7,29
I9755_at	At2g31230	ethylene response factor, putative	7,21
I4672_s_at	At3g54640	tryptophan synthase, alpha subunit (TSA1)	7,21
I4462_at	At2g32130	expressed protein	7,18
I9713_at	At4g18340	glycosyl hydrolase family 17	7,10
I3399_s_at	At4g15975	expressed protein	7,08
I4900_at	At1g27100	expressed protein	7,04
I4077_at	At4g08950	phi-1 phosphate-induced protein -related	7,01
I2958_at	At2g33580	protein kinase -related	6,98
I3656_at	At4g01870	expressed protein	6,96
20128_at	At1g16420	hypothetical protein common family	6,89
I3942_at	At3g50760	glycosyltransferase family 8	6,89

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I9152_at	At5g06760	late embryogenesis abundant protein LEA like	6,87
I5392_at	At2g27080	expressed protein	6,83
I7356_s_at	At4g15280	UDP-glycosyltransferase family	6,78
I3246_at	At3g08760	protein kinase family	6,78
I3271_g_at	At4g18880	heat shock transcription factor 21	6,73
I3177_at	At4g12720	MutT/nudix family protein	6,72
I7900_s_at	At1g09070	C2 domain-containing protein	6,72
I7323_at	At1g11050	protein kinase family	6,69
I7894_at	At2g18690	expressed protein	6,63
I2502_at	At4g19720	glycosyl hydrolase family 18	6,62
I4367_at	At1g60190	hypothetical protein	6,61
I5944_at	At1g53950	ubiquitin family	6,61
I6370_s_at	At4g11170	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	6,57
I7698_at	At2g02230	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	6,51
I5154_s_at	At3g47340	glutamine-dependent asparagine synthetase	6,51
I3810_at	At2g34790	FAD-linked oxidoreductase family	6,50
I7607_s_at	At4g17785	MYB transcription factor like protein	6,42
I3284_s_at	At3g12580	heat shock protein hsp70	6,38
I2123_s_at	At4g14450	hypothetical protein	6,37
I3094_at	At4g25030	expressed protein	6,35
I8672_s_at	At1g27770	calcium-transporting ATPase 1	6,33
I6536_s_at	At5g47230	ethylene responsive element binding factor 5 (AtERF5)	6,26
I2094_at	At2g32030	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family	6,25
I3975_at	At4g08170	inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase-related protein	6,18
I6526_at	At1g80300	adenine nucleotide translocase	6,12
I4250_r_at	At3g52430	phytoalexin-deficient 4 protein (pad4)	6,12
I9059_at	At2g47520	AP2 domain transcription factor, putative	6,09
I5919_at	At1g30755	expressed protein	6,06
I7051_s_at	At2g29720	monooxygenase family	6,05
I4988_at	At1g70140	formin homology 2 (FH2) domain-containing protein	6,05
I9664_at	At4g39230	isoflavone reductase, putative	6,04
I8896_at			6,02
I4310_at	At2g39400	hydrolase, alpha/beta fold family	6,01
I3278_f_at	At5g12030	heat shock protein 17.6A	5,97
I2965_at	At4g18950	protein kinase - like protein	5,93
I2881_s_at	At5g42650	allene oxide synthase / cytochrome P450 74A	5,92
I2315_at	At1g03740	protein kinase family	5,90
I9848_s_at	At2g41100	calmodulin-related protein 3, touch-induced (TCH3)	5,90
I7521_s_at	At5g43380	serine/threonine protein phosphatase type on (TOPP7)	5,87
I9662_s_at	At3g61850	Dof zinc finger transcription factor (DAG1) (BBFa)	5,86
I9767_at	At1g22810	AP2 domain transcription factor TINY, putative	5,85
I3703_s_at	At4g26120	NPR1 like protein	5,82
I2349_s_at	At2g37040	phenylalanine ammonia lyase (PAL1)	5,79
I3277_i_at	At5g12030	heat shock protein 17.6A	5,76
I5039_at	At4g02210	expressed protein	5,75
I3285_s_at	At5g52640	heat shock protein 81-1	5,74
I8235_at	At1g27020	expressed protein	5,72
I8600_at	At3g16720	RING zinc finger protein -related	5,67
I6340_at	At1g61360	S-locus protein kinase family	5,65
I5554_at	At1g64980	expressed protein	5,63
I7881_at	At2g23320	WRKY family transcription factor	5,62
I2128_at	At2g41010	expressed protein	5,59
I7522_s_at	At5g36220	cytochrome P450 91A1	5,58
I2695_at	At4g38940	Kelch repeat containing F-box protein family	5,57
I4638_s_at	At3g49120	peroxidase, putative	5,54
I9096_at	At4g12400	stress inducible protein (sti), putative	5,53
I2339_at	At4g29050	serine threonine-specific kinase like protein	5,51
I2045_at	At1g53990	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	5,51
I8136_s_at	At4g37780	myb DNA-binding protein (AtMYB87)	5,43
I5614_s_at	At4g30270	xyloglucan endotransglycosylase (meri5B)	5,39
I20433_at	At2g27500	glycosyl hydrolase family 17	5,38
I2388_at	At2g39110	protein kinase, putative	5,37
I8930_at	At1g23740	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	5,37
I5098_s_at	At4g35770	senescence-associated protein sen1	5,36
I3381_at	At2g43000	No apical meristem (NAM) protein family	5,36
I7752_at	At2g32800	protein kinase family	5,35
I3685_s_at	At1g61560	seven transmembrane MLO protein family (MLO6)	5,35
I3680_s_at	At1g55020	lipoxygenase (LOX1)	5,33
I6753_at	At4g33920	expressed protein	5,27
I6003_s_at	At4g28390	mitochondrial ADP,ATP carrier protein, putative	5,26
I5540_at	At2g24860	expressed protein	5,25
I4089_at	At2g32150	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	5,22

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
l5886_at	At4g24350	expressed protein	5,20
l6053_i_at	At1g02920	glutathione transferase, putative	5,18
l3467_at	At3g47420	glycerol-3-phosphate transporter (glycerol 3-phosphate permease), putative	5,18
l8590_at	At1g69490	No apical meristem (NAM) protein family	5,16
l8597_at	At4g20860	FAD-linked oxidoreductase family;	5,13
l4491_at	At2g43530	trypsin inhibitor -related	4,98
l7352_at	At2g17220	protein kinase -related	4,95
l6570_s_at	At1g18890	calcium-dependent protein kinase (CDPK1)	4,93
l9110_s_at	At1g61610	S-locus protein kinase, putative	4,93
l5124_s_at	At3g30775	osmotic stress-induced proline dehydrogenase (pro1)	4,92
l3297_s_at	At3g23030	auxin-responsive protein IAA2 (Indoleacetic acid-induced protein 2)	4,92
l8738_f_at	At2g31180	myb family transcription factor	4,92
l8850_at	At5g49620	myb family transcription factor	4,89
l20307_at	At4g37400	cytochrome P450 family	4,87
l2497_at	At2g31890	expressed protein	4,84
l20285_s_at	At2g39660	protein kinase, putative	4,80
l5385_at	At2g41180	expressed protein	4,79
l3880_s_at	At4g25900	aldose 1-epimerase family	4,78
l2209_at	At4g26950	expressed protein	4,77
l2759_at	At1g03230	expressed protein	4,77
l7338_at	At2g47550	pectinesterase family	4,76
l20529_at	At4g16500	cysteine proteinase inhibitor like protein	4,76
l5143_s_at	At4g11840	phospholipase D-gamma, putative	4,74
l9137_at	At1g01720	No apical meristem (NAM) protein family	4,74
l3282_s_at	At4g25200	mitochondrion-localized small heat shock protein	4,74
l3916_at	At2g19800	expressed protein	4,74
l6054_s_at	At1g02920	glutathione transferase, putative	4,73
l20499_at	At2g33480	No apical meristem (NAM) protein family	4,73
l4809_at	At1g47530	ripening regulated protein, putative	4,73
l5040_g_at	At4g02200	drought-induced protein -related	4,73
l9835_at	At1g59740	oligopeptide transporter -related	4,71
l3933_at	At4g17230	scarecrow-like transcription factor 13 (SCL13)	4,70
l3666_s_at	At2g04400	indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS)	4,70
l9993_at	At1g78490	cytochrome P450 family	4,65
l4667_s_at	At5g54810	tryptophan synthase, beta subunit 1 (TSB1)	4,65
l8356_at	At4g23730	aldose 1-epimerase family	4,64
l5475_s_at	At2g40270	protein kinase -related	4,64
l6927_s_at	At4g30270	xyloglucan endotransglycosylase (meri5B)	4,63
l2553_at	At2g14960	auxin-regulated protein -related	4,62
l5367_at	At1g76700	DnaJ protein family	4,62
l3550_at	At4g23180	serine/threonine kinase -related protein	4,61
l4249_i_at	At3g52430	phytoalexin -deficient 4 protein (pad4)	4,59
l6522_at	At5g63850	amino acid transporter 4 (AAP4)	4,58
l7941_at	At2g18720	translation initiation factor eIF-2 gamma subunit, putative	4,56
l5859_at	At2g28570	expressed protein	4,51
l7805_at	At1g52130	jacalin lectin family	4,51
l2574_at	At3g60140	glycosyl hydrolase family 1	4,51
l9433_at	At4g23270	serine/threonine kinase	4,50
l2740_s_at	At5g25980	glycosyl hydrolase family 1	4,50
l6528_at	At1g27130	glutathione transferase, putative	4,49
l20686_at	At3g16860	expressed protein	4,48
l20349_at	At3g49690	myb family transcription factor (AtMYB84)	4,48
l7585_s_at	At2g19570	cytidine deaminase -related	4,48
l8841_at	At1g05470	endonuclease/exonuclease/phosphatase family	4,43
l9471_s_at	At4g32300	S-receptor kinase -related protein	4,43
l9570_at	At3g16280	AP2 domain transcription factor TINY, putative	4,41
l7860_at	At4g27410	No apical meristem (NAM) protein family	4,41
l2801_at	At1g55450	expressed protein	4,40
l4793_at	At2g28305	expressed protein	4,39
l9672_at	At1g43160	AP2 domain transcription factor RAP2.6	4,37
l20370_at	At2g29150	short-chain dehydrogenase/reductase family protein	4,36
l3934_g_at	At4g17230	scarecrow-like transcription factor 13 (SCL13)	4,36
l6357_at	At5g25930	receptor-related protein kinase - like	4,36
l9171_at	At2g43510	trypsin inhibitor -related	4,35
l4016_s_at	At1g30700	FAD-linked oxidoreductase family	4,33
l9227_at	At4g13830	DnaJ protein family	4,33
l7380_at	At4g34180	expressed protein	4,32
l9673_g_at	At1g43160	AP2 domain transcription factor RAP2.6	4,31
l2150_at	At2g44080	expressed protein	4,30
l9202_at	At2g45680	TCP family transcription factor, putative	4,29
l2249_s_at	At2g02220	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	4,27
l6083_s_at	At3g48890	cytochrome b5 domain-containing protein	4,26

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
l7291_at	At4g13000	protein kinase family	4,26
l6554_s_at	At2g01150	C3HC4-type zinc finger protein family (RHA2b)	4,26
l7930_s_at	At4g37520	peroxidase, putative	4,26
20186_at	At1g08630	expressed protein	4,25
l4673_s_at	At4g27070	tryptophan synthase, beta subunit 2 (TSB2)	4,25
l3987_s_at	At2g31180	myb family transcription factor	4,24
l5646_s_at	At1g55920	serine acetyltransferase	4,23
l7445_at	At4g23570	phosphatase - related	4,22
l4554_at	At1g70420	expressed protein	4,21
l6184_at	At2g01290	ribose 5-phosphate isomerase -related	4,20
20331_at	At2g22250	aspartate aminotransferase family	4,20
l9624_at	At4g10040	cytochrome c	4,19
20182_at	At2g13650	vanadate resistance protein -related	4,18
l8544_at	At1g30620	NAD-dependent epimerase/dehydratase family	4,14
l5406_at	At2g42760	expressed protein	4,13
20258_at	At5g24430	calcium-dependent protein kinase, putative (CDPK)	4,11
l9186_s_at	At3g50970	dehydrin (Xero2)	4,11
l6059_s_at	At1g14370	protein kinase (APK2a)	4,10
l5672_s_at	At2g22470	arabinogalactan-protein (AGP2)	4,09
l4627_i_at	At4g16250	phytochrome D (PHYD)	4,09
20297_at	At1g05680	glycosyltransferase family	4,09
l5808_at	At2g30130	lateral organ boundaries (LOB) domain family	4,07
l3963_at	At4g18890	expressed protein	4,06
l8623_at	At4g02880	expressed protein	4,03
l5132_s_at	At2g19570	cytidine deaminase -related	3,98
20235_i_at	At4g23280	receptor-like protein kinase, putative	3,97
l5687_f_at	At4g37790	Homeobox-leucine zipper protein HAT22 (HD-ZIP protein 22)	3,95
l9465_at	At4g19515	disease resistance protein -related	3,91
l8122_at	At2g30360	CBL-interacting protein kinase 11	3,90
l9841_at	At1g11670	MATE efflux protein family	3,89
l6373_i_at			3,88
l5485_at	At2g27310	F-box protein family	3,86
l2027_at	At4g20170	expressed protein	3,85
20346_at	At4g35600	protein kinase family	3,85
l2584_at	At2g44500	axi 1 protein from Nicotiana tabacum -related	3,84
l7657_at	At4g12790	expressed protein	3,84
l5141_s_at	At5g24770	vegetative storage protein Vsp2	3,81
l3273_s_at	At4g36990	heat shock transcription factor 4 (HSF4)	3,81
l3060_at	At1g67230	nuclear matrix constituent protein 1 -related	3,80
l3565_at	At4g37390	auxin-responsive GH3 - like protein	3,79
l2246_s_at	At4g16250	phytochrome D (PHYD)	3,75
l7967_at	At3g46930	protein kinase family	3,74
20689_s_at	At2g43290	calmodulin-like protein (MSS3)	3,73
l2347_at	At1g59820	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	3,73
l7702_at	At2g32250	Mutator-related transposase	3,72
l4643_s_at	At2g03760	steroid sulfotransferase, putative	3,72
l6062_s_at	At4g25470	DRE binding protein (DREB1C)	3,71
l6537_s_at	At1g64060	respiratory burst oxidase protein F (NADPH oxidase) (RbohF) (RbohAp108)	3,71
l4068_s_at	At2g36950	heavy-metal-associated domain-containing protein	3,70
l6263_at	At2g02320	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	3,69
l6346_s_at	At2g32660	disease resistance protein family (LRR)	3,69
20384_at	At4g36010	thaumatin family	3,65
l8465_s_at	At4g03550	callose synthase (1,3-beta-glucan synthase) family	3,65
20714_at	At4g01090	expressed protein	3,65
l5005_s_at	At2g30040	protein kinase family	3,65
l3892_at	At1g70380	F-box protein family	3,64
l2764_f_at	At2g02930	glutathione transferase, putative	3,63
l4544_at	At2g22300	ethylene-induced calmodulin-binding protein, putative	3,63
l5712_s_at	At2g44200	expressed protein	3,63
l8358_at	At3g57630	expressed protein	3,62
l2658_s_at	At4g28420	aminotransferase, putative	3,62
l8635_at	At2g43920	thiol methyltransferase	3,60
20462_at	At3g13380	brassinosteroid receptor kinase-related	3,60
l5176_s_at	At5g12480	calcium-dependent protein kinase 7 (CDPK)(CPK7)	3,58
l6654_at	At4g20010	expressed protein	3,57
20104_at	At2g21900	WRKY family transcription factor	3,52
l2158_at	At1g61660	expressed protein	3,52
l2537_at	At2g46590	Dof zinc finger protein	3,50
l5594_s_at	At5g07440	glutamate dehydrogenase 2	3,49
l4786_at	At2g46140	desiccation related protein -related	3,49
l2490_at	At4g00330	protein kinase family	3,49
l9946_at	At2g23810	senescence-associated protein family	3,44

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I7899_at	At4g15610	expressed integral membrane protein common family	3,40
I3955_at	At5g44810	expressed protein	3,40
I7480_at	At1g44100	amino acid permease 5 (AAP5)	3,38
I9708_at	At2g23420	expressed protein	3,38
I6428_at	At3g01500	carbonic anhydrase, chloroplast precursor	3,36
I7391_at	At4g25670	expressed protein	3,35
I2760_g_at	At1g03230	expressed protein	3,35
I9462_s_at	At3g59700	receptor lectin kinase, putative	3,34
20669_s_at	At2g44970	expressed protein	3,34
I6701_at	At2g02310	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	3,33
I9376_at	At2g17760	chloroplast nucleoid DNA-binding protein -related	3,33
20463_s_at	At2g17480	seven transmembrane MLO protein family (MLO8)	3,30
I6711_s_at	At2g35720	DnaJ protein family	3,29
I8834_at	At2g01430	homeodomain -leucine zipper protein ATHB-17	3,29
I5912_at	At2g27260	expressed protein	3,28
I2571_s_at	At5g26030	ferrochelataase-I	3,28
I2092_at	At1g31130	expressed protein	3,28
I6064_s_at	At3g15210	ethylene responsive element binding factor 4 (ERF4)	3,28
I7103_s_at	At2g01850	xyloglucan endotransglycosylase (EXGT -A3)	3,26
I8567_at	At2g47130	short -chain dehydrogenase/reductase family protein	3,24
I3997_at	At5g26950	MADS-box protein	3,23
I2951_at	At1g10170	expressed protein	3,23
I9879_s_at	At4g15420	PRLI-interacting factor K	3,23
I5891_at	At4g36830	expressed protein	3,22
20263_at	At5g21105	L-ascorbate oxidase, putative	3,22
I9158_at	At3g55740	proline transporter 2 (ProT2)	3,22
I5197_s_at	At2g16500	arginine decarboxylase	3,22
I9172_at	At1g50600	scarecrow-like transcription factor 5 (SCL5)	3,21
I3653_at	At2g25250	expressed protein	3,20
I5335_at	At4g10390	protein kinase family	3,18
I3645_at	At1g05340	expressed protein	3,17
I8268_s_at	At2g46500	ubiquitin family	3,15
I3832_at	At4g38900	bZIP protein; vsf-1 protein	3,15
I7897_at	At4g26690	expressed protein	3,15
I9577_at	At1g65390	disease resistance protein (TIR class), putative	3,14
I6457_s_at	At2g46330	arabinogalactan-protein (AGP16)	3,12
I9823_at	At4g36950	pseudogene, hypothetical protein	3,09
I4529_at	At1g67470	protein kinase family	3,09
I4527_at	At2g30500	expressed protein	3,09
I4620_s_at	At5g18000	transcriptional factor B3 family	3,08
I8782_at	At2g23450	protein kinase family	3,08
I2500_s_at	At1g51760	IAA-Ala hydrolase (IAR3)	3,07
I2772_at	At1g03220	expressed protein	3,06
I4015_s_at	At1g30700	FAD-linked oxidoreductase family	3,06
I5211_s_at	At5g27380	glutathione synthetase (GSH2)	3,06
I2031_at	At4g29670	thioredoxin family	3,05
I7781_at	At3g47780	ABC transporter family protein	3,05
I7442_i_at	At1g78850	curculin-like (mannose-binding) lectin family	3,05
I5586_s_at	At4g26080	protein phosphatase ABI1	3,03
I7579_s_at	At5g44070	phytochelatin synthase	3,02
I2734_f_at	At3g49690	myb family transcription factor (AtMYB84)	3,01
I3687_s_at	At2g17480	seven transmembrane MLO protein family (MLO8)	3,00
I2081_at	At3g16330	expressed protein	2,99
I6466_s_at	At3g09440	heat shock protein hsc70-3	2,98
I6627_s_at	At2g39770	GDP-mannose pyrophosphorylase	2,98
I2207_at	At4g28840	expressed protein	2,97
I6077_s_at	At5g44070	phytochelatin synthase	2,97
I7876_at	At4g15760	monooxygenase 1 (MO1), putative	2,95
I3014_at	At2g30550	lipase (class 3) family	2,94
I5469_at	At1g04000	expressed protein	2,94
I7413_s_at	At5g64120	peroxidase, putative	2,93
I6151_s_at	At5g02290	protein kinase, putative	2,93
I2317_at	At2g02860	sucrose transporter (sucrose-proton symporter), putative	2,93
I8659_at	At5g45350	proline-rich protein family	2,92
I4931_at	At2g04430	MutT/nudix family protein	2,91
I4408_at	At1g76970	expressed protein	2,90
I2357_s_at	At2g26290	protein kinase, putative	2,89
I8311_s_at	At1g53840	pectinesterase family	2,89
I6700_at	At2g02250	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	2,88
I5746_at	At2g31690	lipase (class 3) family	2,88
I9229_at	At1g03905	ABC transporter family protein	2,87
I9463_s_at	At4g39980	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (DHS1)	2,86

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I9644_at	At5g66850	MAP protein kinase	2,84
I7886_at	At2g26190	expressed protein	2,83
I3844_at	At1g79310	expressed protein	2,83
I4609_at	At2g30770	cytochrome P450 71A13	2,83
I8889_at	At4g27350	membrane lipo protein lipid attachment site-containing expressed protein	2,82
I2617_s_at	At2g35390	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	2,81
I5945_at	At1g49240	actin 8	2,81
I6150_s_at	At4g12480	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	2,81
I9345_at	At2g40180	protein phosphatase 2C (PP2C), putative	2,79
I4984_s_at	At4g27570	glycosyltransferase family	2,79
I6115_s_at	At3g61890	homeobox-leucine zipper protein ATHB-12	2,78
I2634_s_at	At4g19230	cytochrome P450 family	2,78
I7887_at	At2g46260	POZ domain protein family	2,77
I9844_at	At4g38540	monooxygenase 2 (MO2)	2,77
I6582_s_at	At1g10480	C2H2-type zinc finger protein family	2,76
I9207_at	At2g01670	MutT/nudix family protein	2,76
I8278_at	At2g26140	FtsH protease, putative	2,75
I5791_s_at	At2g41890	receptor-related protein kinase	2,75
I4431_at	At4g23810	WRKY family transcription factor	2,75
I7627_at	At1g34260	expressed protein	2,74
I3217_s_at	At3g50770	calmodulin-related protein, putative	2,74
I7208_at	At4g36620	GATA zinc finger protein	2,74
I6686_at	At2g44770	expressed protein	2,73
I6084_s_at	At1g05200	glutamate receptor family (GLR3.4)	2,72
I3806_at	At2g17040	No apical meristem (NAM) protein family	2,71
I4750_s_at	At4g01540	NAM protein -related	2,71
I3236_s_at	At4g39980	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (DHS1)	2,71
I6108_s_at	At2g24180	cytochrome P450 family	2,70
20167_i_at	At2g45300	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	2,70
I6060_s_at	At1g08930	ERD6 protein	2,68
20432_at	At1g32170	xyloglucan endotransglycosylase (XTR4), putative	2,68
I2616_i_at	At2g35390	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	2,68
20168_s_at	At2g45300	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	2,68
20576_at	At4g31820	phototropic response protein family	2,67
I5359_at	At4g26810	hypothetical protein	2,66
I8699_i_at	At5g15970	cold-regulated protein COR6.6 (stress-induced protein KIN2)	2,65
I5669_s_at	At1g06570	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD)	2,64
I4595_at	At4g19390	expressed protein	2,64
I4780_at	At2g38340	AP2 domain transcription factor, putative (DREB2)	2,64
I4637_s_at	At5g38280	receptor serine/threonine kinase PR5K	2,64
I4686_s_at	At1g09970	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	2,62
I7301_at	At4g02660	expressed protein	2,61
I8748_f_at	At5g57620	myb family transcription factor	2,61
20382_s_at	At2g30250	WRKY family transcription factor	2,61
I2175_at	At2g02180	TOM3 protein	2,58
I3966_at	At4g35110	expressed protein	2,58
I3895_at	At2g39420	esterase/lipase/thioesterase family	2,57
I7094_s_at	At3g25230	peptidylprolyl isomerase (ROF1)	2,57
I6298_at	At4g21850	expressed protein	2,56
I7104_s_at	At4g35640	acetyltransferase family	2,56
I6623_s_at	At5g57620	myb family transcription factor	2,56
20715_at	At5g42940	expressed protein	2,55
I7655_at	At4g09950	AIG1-related protein	2,54
I6721_at	At2g31865	poly(ADP-ribose) glycohydrolase-related	2,53
I4293_at	At4g29930	bHLH protein family	2,53
I6393_s_at	At2g13790	leucine-rich repeat protein kinase family	2,51
I2333_at	At4g36430	peroxidase, putative	2,51
I3152_s_at	At1g05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACC oxidase)	2,51
I6672_at	At5g44290	cyclin-dependent protein kinase-related protein	2,50
I7441_s_at	At1g78860	curculin-like (mannose-binding) lectin family	2,49
20469_at	At1g60030	permease-related	2,49
I5836_at	At2g35390	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	2,48
I5142_s_at	At1g22360	UDP-glycosyltransferase family	2,48
20189_at	At1g10140	expressed protein	2,48
I9464_at	At2g01450	mitogen-activated protein kinase (MAPK), putative (MPK17)	2,47
I2446_at	At1g30810	expressed protein	2,47
I8594_at	At1g01470	expressed protein	2,47
I8210_at	At4g19020	chromomethylase CMT2	2,47
I4072_at	At1g67480	Kelch repeat containing F-box protein family	2,46
I3860_s_at	At2g46520	cellular apoptosis susceptibility protein (importin-alpha re-exporter), putative	2,46
I4388_at	At2g35510	expressed protein	2,45
I4902_s_at	At2g30400	hypothetical protein	2,44

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I2051_at	At4g17900	expressed protein	2,44
I7963_at	At4g12470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	2,44
I8480_at	At4g36150	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	2,44
I2718_f_at	At3g01530	myb family transcription factor	2,42
I3807_at	At2g47560	hypothetical protein	2,42
I5082_at	At1g15140	oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein	2,41
I2487_at	At2g47000	P-glycoprotein, putative	2,41
I4490_at	At2g06530	expressed protein	2,41
I8701_s_at	At5g15960	stress-induced protein KIN1	2,40
I9845_g_at	At4g38540	monooxygenase 2 (MO2)	2,40
I9735_g_at	At3g26630	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2,39
I20373_at	At4g39890	Ras family GTP-binding protein	2,38
I5683_s_at	At2g20960	pEARL1 4 protein; Same as GB: L43081	2,37
I7292_at	At5g49630	amino acid permease 6 (AAP6)	2,37
I6412_s_at	At4g21400	serine threonine protein kinase-like protein	2,37
I4955_at	At5g63570	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 1 (GSA 1)	2,36
I6008_i_at	At2g47730	glutathione transferase, putative (GST6)	2,36
I20570_at	At4g12430	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	2,35
I6134_s_at	At3g05200	RING-H2 zinc finger protein ATL6-related	2,35
I4455_at	At1g61640	expressed protein	2,34
I5461_at	At2g36470	expressed protein	2,34
I8287_at	At2g37940	expressed protein	2,33
I2293_at	At2g44490	glycosyl hydrolase family 1	2,32
I6087_s_at	At3g08730	ribosomal-protein S6 kinase (ATPK6)-related	2,32
I5532_r_at	At4g24340	expressed protein	2,32
I8745_f_at	At4g34990	myb family transcription factor	2,32
I6072_s_at	At5g65790	myb DNA-binding protein (MYB68)	2,32
I9641_at	At2g29490	glutathione transferase, putative	2,31
I8198_at	At2g45400	dihydroflavonol 4-reductase (dihydrokaempferol 4-reductase) family	2,31
I4932_at	At2g01880	purple acid phosphatase (PAP7)	2,31
I7485_s_at	At4g16260	glycosyl hydrolase family 17	2,29
I7510_s_at	At2g46340	photomorphogenesis repressor protein-related	2,29
I4781_at	At2g22850	bZIP family transcription factor	2,29
I7458_at	At2g37110	expressed protein	2,29
I6792_at	At2g46070	mitogen-activated protein kinase (MAPK), putative (MPK12)	2,29
I3214_s_at	At3g47470	light-harvesting chlorophyll a/b binding protein	2,29
I5960_at	At3g09440	heat shock protein hsc70-3 (hsc70.3)	2,28
I7552_s_at	At4g03510	E3 ubiquitin ligase, RMA1	2,28
I2937_r_at	At3g51030	thioredoxin H-type 1 (TRX-H-1)	2,28
I2282_at	At5g44800	chromodomain-helicase-DNA-binding (CHD) protein family	2,27
I9183_at	At4g25210	expressed protein	2,26
I4498_at	At2g41160	expressed protein	2,26
I9995_at	At4g32551	WD-40 repeat protein family	2,25
I9854_at	At2g43020	amine oxidase family	2,25
I2002_at	At4g02940	oxido reductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	2,25
I3480_at	At1g55530	expressed protein	2,25
I6981_s_at	At1g45145	thioredoxin H-type 5 (TRX-H-5)	2,24
I5520_s_at	At4g27760	oxidoreductase, forever young (FEY3)	2,24
I4779_at	At2g30010	expressed protein	2,24
I20163_s_at	At4g15140	expressed protein	2,22
I9135_at	At2g38750	annexin-related	2,22
I6088_f_at	At5g04870	calcium-dependent protein kinase (CDPK)(AK1)	2,22
I9992_at	At4g01950	phospholipid/glycerol acyltransferase family	2,20
I3706_s_at	At2g18700	glycosyl transferase family 20	2,20
I7877_g_at	At4g15760	monooxygenase 1 (MO1), putative	2,18
I5125_f_at	At5g24780	vegetative storage protein Vsp1	2,18
I3136_at	At4g12040	expressed protein	2,18
I3681_s_at	At4g20380	zinc-finger protein Lsd1	2,17
I8720_s_at	At5g61210	syntaxin SNAP33	2,17
I9368_at	At1g27200	expressed protein	2,16
I2627_at	At2g31800	protein kinase-related	2,16
I8901_at	At2g44450	glycosyl hydrolase family 1	2,16
I3189_s_at	At1g45145	thioredoxin H-type 5 (TRX-H-5)	2,16
I6914_s_at	At4g11650	osmotin-like protein (OSM34)	2,16
I4468_at	At1g14200	C3HC4-type zinc finger protein family	2,15
I9741_at	At4g26270	pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase	2,14
I2912_s_at	At5g58720	PRL1 associated protein-related	2,14
I9426_s_at	At3g44630	disease resistance protein RPP1-WsB-like (TIR-NBS-LRR class), putative	2,13
I9443_at	At4g36140	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	2,13
I8032_i_at	At2g47070	squamosa-promoter binding protein-related	2,13
I8966_at	At2g29420	glutathione transferase, putative	2,12
I5866_s_at	At2g38860	(YLS5) proteaseI (pfpI)-like protein	2,11

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I8451_s_at	At4g33710	pathogenesis-related protein, putative	2,11
I8719_r_at	At5g61210	syntaxin SNAP33	2,10
I8995_at	At1g11960	expressed protein	2,10
I6690_g_at	At2g47070	squamosa-promoter binding protein -related	2,10
I5091_at	At2g38360	expressed protein	2,09
I2736_f_at	At1g06180	myb family transcription factor	2,09
I9175_at	At2g45920	expressed protein	2,09
I2521_at	At3g51860	cation exchanger, putative (CAX3)	2,08
I8768_at	At2g38760	annexin -related	2,07
I5145_s_at	At1g02205	CER1 protein	2,07
I2390_at	At2g42270	U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase, putative	2,07
I6499_at	At4g32020	expressed protein	2,07
I2767_at	At2g23120	expressed protein	2,06
I5517_s_at	At4g28480	heat shock protein, putative	2,05
I5900_at	At2g31090	expressed protein	2,05
I4460_at	At2g18090	expressed protein	2,05
I4464_at	At2g13790	leucine-rich repeat protein kinase family	2,04
I6779_at	At2g39480	ABC transporter family protein	2,03
I6972_at	At2g41120	expressed protein	2,03
I5803_at	At1g70390	F-box protein family	2,02
I5526_at	At1g10040	expressed protein	2,01
I8706_s_at	At2g14750	adenosine phosphosulfate kinase -related	2,01
I7524_s_at	At2g46410	myb-related protein CAPRICE (CPC)	2,00
I2443_s_at	At4g34480	glycosyl hydrolase family 17	2,00
I20402_s_at	At1g51950	auxin-responsive protein IAA18 (Indoleacetic acid-induced protein 18)	2,00
I8980_at	At2g33700	protein phosphatase 2C (PP2C)	1,99
I7457_at	At4g13010	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	1,99
I2643_at	At1g34180	No apical meristem (NAM) protein family	1,99
I20685_at	At4g13180	short -chain dehydrogenase/reductase family protein	1,98
I6606_s_at	At5g62000	auxin response factor - like protein	1,97
I20242_at	At4g09570	calcium-dependent protein kinase, putative (CDPK)	1,97
I8497_at	At2g32120	heat shock protein hsp70t-2	1,95
I20653_s_at	At3g48090	disease resistance protein (EDS1)	1,94
I4239_s_at	At1g64280	transcription factor inhibitor I kappa B -related	1,93
I8010_s_at	At3g54110	uncoupling protein (ucp/PUMP)	1,92
I9073_at	-	-	1,92
I7531_s_at	At2g32930	expressed protein	1,92
I7241_at	At2g47820	expressed protein	1,85
I4964_at	At1g65500	expressed protein	1,76

Tabelle 34: Sondensätze, die in *A. halleri* bei Cu als induziert eingestuft wurden.

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I20489_at	At2g44840	ethylene response element binding protein (EREBP), putative	109,66
I8224_s_at	At4g21830	expressed protein	74,84
I7134_at	At1g08860	copine, putative	52,36
I6620_s_at	At5g57560	xyloglucan endotransglycosylase (TCH4)	51,07
I7533_s_at	At4g25810	xyloglucan endotransglycosylase (XTR6)	46,01
I9991_at	At2g35980	harpin -induced protein 1 family (HIN1)	45,48
I9178_at	At5g20230	plastocyanin-like domain containing protein	33,70
I8668_at	At1g17420	lipoxygenase (LOX), putative	29,40
I8267_at	At2g32210	expressed protein	27,72
I9182_at	At4g33050	expressed protein	25,79
I7381_at	At4g36500	expressed protein	23,91
I6539_s_at	At4g17490	ethylene responsive element binding factor (ERF6)	19,12
I9892_at	At2g38870	protease inhibitor -related	18,71
I9152_at	At5g06760	late embryogenesis abundant protein LEA like	18,25
I6363_at	At1g61370	receptor protein kinase (IRK1) -related	18,06
I20438_at	At1g10370	glutathione transferase, putative	17,79
I8228_at	At3g15356	lectin -related	16,92
I6063_s_at	At4g17500	ethylene responsive element binding factor 1 (frameshift !)	16,31
I3842_at	At1g24140	metallo proteinase -related	16,03
I9970_s_at	At2g39650	expressed protein	15,85
I9459_at	At4g36880	cysteine proteinase	15,29
I5431_at	At4g27280	calcium-binding EF-hand family protein	15,02
I6440_s_at	At2g40000	nematode-resistance protein -related	14,06
I8631_at	At2g41640	expressed protein	13,83
I7008_at	At2g24850	aminotransferase, putative	13,62
I8217_g_at	At1g27730	salt-tolerance zinc finger protein	13,28

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
l8253_s_at	At1g76680	12-oxophytodienoate reductase (OPR1)	13,21
l2356_at	At5g06720	peroxidase, putative	13,11
l6059_s_at	At1g14370	protein kinase (APK2a)	12,54
l8597_at	At4g20860	FAD-linked oxidoreductase family;	12,38
l5774_at	At4g11800	calcineurin-like phosphoesterase family	12,37
l4310_at	At2g39400	hydrolase, alpha/beta fold family	12,31
l3834_at	At4g01010	cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC13)	12,00
l5424_at	At3g50930	AAA-type ATPase family	11,97
l2658_s_at	At4g28420	aminotransferase, putative	11,67
l4608_at	At1g13210	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	11,65
l8126_s_at	At4g28350	receptor protein kinase like protein	11,61
l6344_at	At1g61550	S-locus protein kinase, putative	11,08
l6536_s_at	At5g47230	ethylene responsive element binding factor 5 (AtERF5)	10,78
l2270_at	At4g27300	S-locus protein kinase, putative	10,74
l8680_s_at	At3g11170	omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor (FAD7)	10,48
l7303_s_at	At2g38470	WRKY family transcription factor	10,28
20620_g_at	At2g37430	C2H2-type zinc finger protein-related	9,85
l7653_at	At4g39030	enhanced disease susceptibility 5 (Eds5)	9,74
l3381_at	At2g43000	No apical meristem (NAM) protein family	9,65
l6817_s_at	At4g11280	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 (ACC synthase 6)	9,42
l6792_at	At2g46070	mitogen-activated protein kinase (MAPK), putative (MPK12)	9,24
l6586_s_at	At4g26100	casein kinase, putative	9,11
l2737_f_at	At3g23250	myb family transcription factor (MYB15)	8,83
l6638_s_at	At3g28210	zinc finger protein (PMZ) -related	8,01
l2790_s_at	At4g22690	cytochrome P450 family	7,93
l2891_at	At4g11280	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 (ACC synthase 6)	7,87
l9713_at	At4g18340	glycosyl hydrolase family 17	7,86
20480_s_at	At4g39950	cytochrome P450 79B2	7,69
20499_at	At2g33480	No apical meristem (NAM) protein family	7,52
l4918_at	At2g32020	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family	7,37
l4763_at	At3g09010	protein kinase family	7,35
20051_at	At1g08940	expressed protein	7,24
l2892_g_at	At4g11280	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 (ACC synthase 6)	7,11
l5341_at	At2g32200	hypothetical protein	7,10
l9345_at	At2g40180	protein phosphatase 2C (PP2C), putative	7,03
l4643_s_at	At2g03760	steroid sulfotransferase, putative	7,02
l2712_f_at	At1g18570	myb family transcription facto	6,93
l3255_i_at	At4g39640	gamma-glutamyltransferase-related	6,90
l2249_s_at	At2g02220	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	6,87
l9077_at	At1g04150	C2 domain-containing protein	6,85
l4711_s_at	At2g40140	CCCH-type zinc finger protein-related	6,60
l5594_s_at	At5g07440	glutamate dehydrogenase 2	6,58
l3247_f_at	At3g11170	omega-3 fatty acid desaturase, chloroplast precursor (FAD7)	6,57
l3550_at	At4g23180	serine/threonine kinase-related protein	6,51
l4030_at	At2g05940	protein kinase, putative	6,41
l4882_at	At4g39670	expressed protein	6,27
l8662_s_at	At4g24160	hydrolase, alpha/beta fold family	6,22
l9843_at	At1g61890	MATE efflux protein family	6,12
l6232_s_at	At2g05050	pseudogene, protein phosphatase 2C	6,07
l7960_at	At1g65310	xyloglucan endotransglycosylase, putative	5,97
l9462_s_at	At3g59700	receptor lectin kinase, putative	5,93
l7119_s_at	At2g06050	12-oxophytodienoate reductase (OPR3)(DDE1)	5,90
l3789_at	At1g30040	gibberellin 2-oxidase (GA2-oxidase)	5,87
l7886_at	At2g26190	expressed protein	5,76
l8544_at	At1g30620	NAD-dependent epimerase/dehydratase family	5,75
l3908_s_at	At4g20860	FAD-linked oxidoreductase family	5,72
l5203_s_at	At1g68840	AP2 domain protein RAP2.8 (RAV2)	5,70
l5550_at	At1g15200	expressed protein	5,64
l3435_at	At4g06746	AP2 domain transcription factor family	5,64
l8591_at	At5g08790	No apical meristem (NAM) protein family	5,51
l3538_at	At4g20780	calcium-binding protein, putative	5,48
l6916_s_at	At5g02490	heat shock protein hsc70-2	5,45
l2251_at	At2g34930	disease resistance protein family	5,42
l7300_at	At4g30210	NADPH-ferrihemoprotein reductase	5,41
l2324_i_at	At2g18150	peroxidase, putative	5,40
l9664_at	At4g39230	isoflavone reductase, putative	5,38
l2965_at	At4g18950	protein kinase-like protein	5,35
l5817_at	At4g37240	expressed protein	5,35
l2209_at	At4g26950	expressed protein	5,31
l4879_g_at	At4g32160	expressed protein	5,24
l3177_at	At4g12720	MutT/nudix family protein	5,14
l2256_at	At2g24130	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	5,14

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I6357_at	At5g25930	receptor-related protein kinase - like	5,12
I3273_s_at	At4g36990	heat shock transcription factor 4 (HSF4)	5,09
I2045_at	At1g53990	GDSL-motif lipase/hydrolase protein	5,07
I5647_s_at	At4g14680	ATP-sulfurylase	4,98
I4450_at	At1g79160	expressed protein	4,97
I4250_r_at	At3g52430	phytoalexin -deficient 4 protein (pad4)	4,86
20433_at	At2g27500	glycosyl hydrolase family 17	4,81
I9841_at	At1g11670	MATE efflux protein family	4,74
I7592_at	At1g50490	ubiquitin-conjugating enzyme (UBC20)	4,73
I7392_s_at	At3g53260	phenylalanine ammonia-lyase (PAL2)	4,63
I4089_at	At2g32150	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	4,61
I5523_s_at	At4g24370	expressed protein	4,60
I3246_at	At3g08760	protein kinase family	4,60
I6716_at	At2g21120	expressed protein	4,59
I3361_at	At1g70170	matrix metallo proteinase-related	4,57
I5791_s_at	At2g41890	receptor-related protein kinase	4,53
I5665_s_at	At5g04340	c2h2 zinc finger transcription factor -related	4,43
I2293_at	At2g44490	glycosyl hydrolase family 1	4,38
I8946_at	At5g39580	peroxidase, putative	4,33
I2128_at	At2g41010	expressed protein	4,29
I7105_s_at	At5g47910	respiratory burst oxidase protein D (NADPH oxidase)	4,24
20144_at	At4g25390	protein kinase family	4,24
I3706_s_at	At2g18700	glycosyltransferase family 20	4,23
I5687_f_at	At4g37790	Homeobox-leucine zipper protein HAT22 (HD-ZIP protein 22)	4,22
I3966_at	At4g35110	expressed protein	4,17
I3189_s_at	At1g45145	thioredoxin H-type 5 (TRX-H-5)	4,16
I2150_at	At2g44080	expressed protein	4,12
I8216_at	At1g27730	salt-tolerance zinc finger protein	4,10
I8445_at	At2g28080	glycosyltransferase family	4,07
I3015_s_at	At5g59820	zinc finger protein Zat12	4,06
20291_s_at	At5g05730	anthranilate synthase, alpha subunit, component I-1 (ASA1)	4,04
I4793_at	At2g28305	expressed protein	4,02
I5389_at	At2g22860	(AtPSK) phytosulfokine precursor 2	3,96
I6457_s_at	At2g46330	arabinogalactan-protein (AGP16)	3,95
I7514_s_at	At3g23240	ethylene response factor 1 (ERF1)	3,94
I7379_at	At2g40140	CCCH-type zinc finger protein -related	3,88
I3152_s_at	At1g05010	l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACC oxidase)	3,82
I4077_at	At4g08950	phi-1 phosphate-induced protein -related	3,75
I5483_s_at	At2g46650	cytochrome b5, putative	3,70
I8213_at	At4g22070	WRKY family transcription factor	3,67
I8963_at	At2g29440	glutathione transferase, putative	3,66
I2502_at	At4g19720	glycosyl hydrolase family 18	3,62
I6570_s_at	At1g18890	calcium-dependent protein kinase (CDPK1)	3,62
20189_at	At1g10140	expressed protein	3,62
I4070_at	At3g47960	peptide transporter -related	3,60
I5620_s_at	At1g51680	4-coumarate:CoA ligase I (4-coumaroyl-CoA synthase 1) (4CL1), putative	3,57
I8876_at	At2g39980	transferase family	3,51
I4900_at	At1g27100	expressed protein	3,50
I2443_s_at	At4g34480	glycosyl hydrolase family 17	3,50
I7930_s_at	At4g37520	peroxidase, putative	3,47
I6134_s_at	At3g05200	RING-H2 zinc finger protein ATL6-related	3,46
I2335_at	At2g47060	serine/threonine protein kinase, putative	3,46
20104_at	At2g21900	WRKY family transcription factor	3,45
I2094_at	At2g32030	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family	3,44
I2958_at	At2g33580	protein kinase -related	3,39
20258_at	At5g24430	calcium-dependent protein kinase, putative (CDPK)	3,37
I4924_at	At2g28400	expressed protein	3,32
I4320_at	At2g42360	RING zinc finger protein -related	3,27
I7157_at	At2g02340	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	3,25
I2698_at	At1g08920	sugar transporter, putative	3,24
I9409_at	At1g13245	expressed protein	3,23
20285_s_at	At2g39660	protein kinase, putative	3,23
I4744_at	At1g59910	formin homology 2 (FH2) domain -containing protein	3,22
I8896_at			3,21
I6981_s_at	At1g45145	thioredoxin H-type 5 (TRX-H-5)	3,20
I4544_at	At2g22300	ethylene-induced calmodulin-binding protein, putative	3,19
I3534_at	At5g25940	nodulin - like protein	3,17
I6184_at	At2g01290	ribose 5-phosphate isomerase-related	3,16
I6340_at	At1g61360	S-locus protein kinase family	3,15
20209_at	At4g39400	brassinosteroid insensitive 1 (BRI1)	3,14
I9946_at	At2g23810	senescence-associated protein family	3,14
I2571_s_at	At5g26030	ferrochelatase-I	3,12

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
20479_i_at	At4g39950	cytochrome P450 79B2	3,11
14609_at	At2g30770	cytochrome P450 71A13	3,09
12760_g_at	At1g03230	expressed protein	3,09
18949_at	At5g67310	cytochrome P450 family	3,07
17148_at	At1g60440	pantothenate kinase -related	3,06
16088_f_at	At5g04870	calcium-dependent protein kinase (CDPK)(AK1)	3,06
16412_s_at	At4g21400	serine threonine protein kinase - like protein	3,05
17047_s_at	At4g35480	RING-H2 finger protein RHA3b	3,05
19220_at	At5g59450	scarecrow-like transcription factor 11 (SCL119)	3,05
16571_s_at	At1g35670	calcium-dependent protein kinase (CDPK)	2,99
12315_at	At1g03740	protein kinase family	2,99
20142_at	At4g34390	extra-large G-protein - like	2,95
17899_at	At4g15610	expressed integral membrane protein common family	2,94
17292_at	At5g49630	amino acid permease 6 (AAP6)	2,92
15677_s_at	At2g47170	ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)	2,92
13115_at	At1g62300	WRKY family transcription factor	2,89
14965_at	At2g17300	expressed protein	2,88
13187_i_at	At1g45145	thioredoxin H-type 5 (TRX-H-5)	2,87
17755_at	At4g25090	respiratory burst oxidase (NADPH oxidase), putative	2,87
16753_at	At4g33920	expressed protein	2,86
17291_at	At4g13000	protein kinase family	2,85
12561_at	At4g19120	ERD3 protein	2,82
12817_g_at	At1g78830	curculin-like (mannose-binding) lectin family	2,82
12503_at	At2g33710	AP2 domain transcription factor family	2,78
15475_s_at	At2g40270	protein kinase -related	2,77
19383_at	At2g01340	expressed protein	2,77
20294_at	At4g33420	peroxidase, putative	2,77
15556_at	At1g21830	expressed protein	2,75
19845_g_at	At4g38540	monooxygenase 2 (MO2)	2,74
16060_s_at	At1g08930	ERD6 protein	2,73
17877_g_at	At4g15760	monooxygenase 1 (MO1), putative	2,72
12801_at	At1g55450	expressed protein	2,71
18284_at	At4g34150	C2 domain -containing protein	2,70
20517_at	At5g59430	telomere repeat -binding protein	2,69
12347_at	At1g59820	haloacid dehalogenase-like hydrolase family	2,69
13094_at	At4g25030	expressed protein	2,66
19707_s_at	At5g67310	cytochrome P450 family	2,66
20658_s_at	At4g25700	beta-carotene hydroxylase	2,65
17881_at	At2g23320	WRKY family transcription factor	2,64
14667_s_at	At5g54810	tryptophan synthase, beta subunit 1 (TSB1)	2,63
18708_at	At5g62350	pectinesterase family	2,62
20432_at	At1g32170	xyloglucan endotransglycosylase (XTR4), putative	2,61
15933_at	At1g21830	expressed protein	2,61
18594_at	At1g01470	expressed protein	2,61
15046_s_at	At2g39710	expressed protein	2,60
13625_s_at	At3g50960	expressed protein	2,60
20689_s_at	At2g43290	calmodulin-like protein (MSS3)	2,59
16712_at	At2g35710	glycogenin glucosyltransferase (glycogenin) - related	2,59
19176_at	At4g26400	expressed protein	2,57
12772_at	At1g03220	expressed protein	2,56
18672_s_at	At1g27770	calcium-transporting ATPase 1	2,56
12816_at	At1g78830	curculin-like (mannose-binding) lectin family	2,56
14116_at	At5g26340	hexose transporter, putative	2,55
20060_at	At1g10370	glutathione transferase, putative	2,53
16108_s_at	At2g24180	cytochrome P450 family	2,53
20331_at	At2g22250	aspartate aminotransferase family	2,51
13645_at	At1g05340	expressed protein	2,51
17352_at	At2g17220	protein kinase -related	2,51
17752_at	At2g32800	protein kinase family	2,50
16467_s_at	At1g08510	acyl-(acyl carrier protein) thioesterase -related	2,50
17323_at	At1g11050	protein kinase family	2,48
12349_s_at	At2g37040	phenylalanine ammonia lyase (PAL1)	2,47
20167_i_at	At2g45300	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EPSP synthase)	2,47
18885_at	At2g36220	expressed protein	2,46
13942_at	At3g50760	glycosyltransferase family 8	2,44
17535_s_at	At4g02195	syntaxin of plants SYP42 (TLG2b)	2,44
16623_s_at	At5g57620	myb family transcription factor	2,44
15646_s_at	At1g55920	serine acetyltransferase	2,43
15143_s_at	At4g11840	phospholipase D-gamma, putative	2,42
12584_at	At2g44500	axi 1 protein from Nicotiana tabacum -related	2,41
13173_at	At2g31400	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	2,41
12956_i_at	At1g05170	galactosyltransferase family	2,41

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I1315_s_at	At4g28400	protein phosphatase 2C (PP2C), putative	2,41
I5601_s_at	At2g34770	fatty acid hydroxylase (FAH1)	2,40
I2388_at	At2g39110	protein kinase, putative	2,39
I7224_s_at	At2g32840	proline-rich protein family	2,38
I3685_s_at	At1g61560	seven transmembrane MLO protein family (MLO6)	2,37
I2726_f_at	At4g37270	ATPase, E1-E2 type family	2,36
I6299_at	At4g19880	expressed protein	2,36
I7900_s_at	At1g09070	C2 domain-containing protein	2,34
I9471_s_at	At4g32300	S-receptor kinase-related protein	2,33
I8176_at	At4g38470	protein kinase family	2,33
I7338_at	At2g47550	pectinesterase family	2,33
I9521_s_at	At2g27880	argonaute (AGO1) protein, putative	2,33
I8782_at	At2g23450	protein kinase family	2,33
I5672_s_at	At2g22470	arabinogalactan-protein (AGP2)	2,33
I9742_at	At1g04370	ethylene response factor, putative	2,33
I2497_at	At2g31890	expressed protein	2,31
I6972_at	At2g41120	expressed protein	2,31
I7600_s_at	At5g42650	allene oxide synthase / cytochrome P450 74A	2,31
I8276_at	At1g03600	photosystem II protein family	2,31
I2317_at	At2g02860	sucrose transporter (sucrose-proton symporter), putative	2,28
I7441_s_at	At1g78860	curculin-like (mannose-binding) lectin family	2,28
I8512_at	At1g24100	UDP-glycosyltransferase family	2,27
I5629_s_at	At1g17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH)	2,27
20168_s_at	At2g45300	β -phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EPSP synthase)	2,26
20269_at	At2g45220	pectinesterase family	2,25
I9181_s_at	At4g02380	late embryogenesis abundant protein family	2,25
I6466_s_at	At3g09440	heat shock protein hsc70-3	2,25
I6054_s_at	At1g02920	glutathione transferase, putative	2,25
I4955_at	At5g63570	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 1 (GSA 1)	2,24
I5176_s_at	At5g12480	calcium-dependent protein kinase 7 (CDPK)(CPK7)	2,24
I3895_at	At2g39420	esterase/lipase/thioesterase family	2,23
I4779_at	At2g30010	expressed protein	2,23
I4672_s_at	At3g54640	tryptophan synthase, alpha subunit (TSA1)	2,22
I5211_s_at	At5g27380	glutathione synthetase (GSH2)	2,22
I2375_s_at	At4g37270	ATPase, E1-E2 type family	2,22
I6553_f_at	At4g11360	RING-H2 finger protein RHA1b	2,21
I3916_at	At2g19800	expressed protein	2,21
I5091_at	At2g38360	expressed protein	2,21
I5978_at	At5g13490	mitochondrial ADP,ATP carrier protein 2	2,21
I8703_at	AtMg00513	nad5a	2,20
I3562_at	At1g70410	carbonic anhydrase-related	2,20
I8122_at	At2g30360	CBL-interacting protein kinase 11	2,19
I6807_at	At2g34650	protein kinase (PINOID/PID)	2,19
20262_at	At1g61140	SNF2 domain/helicase domain/RING finger domain-containing protein	2,19
I6528_at	At1g27130	glutathione transferase, putative	2,17
I5403_s_at	At2g31730	expressed protein	2,16
I5392_at	At2g27080	expressed protein	2,15
20352_at	At1g11100	SNF2 domain/helicase domain-containing protein	2,14
I3900_s_at	At3g47380	pectinesterase-related	2,14
I6881_at	At1g69990	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	2,13
I4249_i_at	At3g52430	phytoalexin-deficient 4 protein (pad4)	2,13
I5937_at	At4g17840	expressed protein	2,13
I7445_at	At4g23570	phosphatase-related	2,13
I6393_s_at	At2g13790	leucine-rich repeat protein kinase family	2,12
I5197_s_at	At2g16500	arginine decarboxylase	2,12
I7579_s_at	At5g44070	phytochelatin synthase	2,10
I6080_f_at	At1g66580	60S ribosomal protein L10 (RPL10C)	2,10
I5919_at	At1g30755	expressed protein	2,09
I9883_at	At4g22590	trehalose-6-phosphate phosphatase, putative	2,09
I6008_i_at	At2g47730	glutathione transferase, putative (GST6)	2,07
I7010_s_at	At2g20670	expressed protein	2,07
I8268_s_at	At2g46500	ubiquitin family	2,07
I7781_at	At3g47780	ABC transporter family protein	2,07
I5859_at	At2g28570	expressed protein	2,07
I2438_at	At4g18430	GTP-binding protein, putative	2,04
I2325_at	At4g38420	pectinesterase (pectin methyltransferase), putative	2,02
I8745_f_at	At4g34990	myb family transcription factor	2,02
20242_at	At4g09570	calcium-dependent protein kinase, putative (CDPK)	1,99
I3920_at	At1g23710	expressed protein	1,99
I7499_s_at	At2g46430	cyclic nucleotide-regulated ion channel (CNGC3)	1,98
I8735_s_at	At4g23100	gamma-glutamylcysteine synthetase	1,96
I6465_at	At5g02490	heat shock protein hsc70-2	1,96

Affymetrix-Code	AGI-Code	Genprodukt	Mittelwert der Induktion
I7075_s_at	At5g22300	Nitrilase 4	1,95
I5425_at	At4g32050	expressed protein	1,94
I3332_at	At2g26830	choline kinase -related	1,93
I2685_at	At2g24430	No apical meristem (NAM) protein family	1,93
I4653_s_at	At4g34650	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (squalene synthase 2)	1,92
I3154_s_at	At2g43590	glycosyl hydrolase family 19 (chitinase)	1,91
I9137_at	At1g01720	No apical meristem (NAM) protein family	1,86
I6298_at	At4g21850	expressed protein	1,86
I9635_at	At3g47730	ABC transporter family protein	1,85
I9708_at	At2g23420	expressed protein	1,78
I7923_s_at	At4g36360	glycosyl hydrolase family 35 (beta-galactosidase)	1,75
I3588_at	At4g34200	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH), putative	1,72
I7121_s_at	At1g02580	maternal embryogenesis control protein (MEDEA)	1,60

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die guten Arbeitsmöglichkeiten am IPB, sowie für seine freundliche und fördernde Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stephan Clemens für die Überlassung des spannenden Themas, seine stetige Diskussionsbereitschaft, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie für seine freundliche und äußerst fachkundige Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Klaus Humbeck von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Anfertigung des Gutachtens.

Vielen Dank an Prof. Dr. Stefan Burdach für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Labor zur Durchführung der Microarray-Analysen. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Frau Silke Bergmann, Frau Ines Volkmer und Herrn Christoph Hutter für die erstklassige Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der Microarrays.

Ein herzlicher Dank geht an die Mitglieder der Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein ganz großer Dank an Marina Häußler, der guten Seele in unserer Arbeitsgruppe, ohne die vieles bedeutend schwerer gewesen wäre. Mein spezieller Dank geht an Dr. Udo Roth, für die Hilfe bei der Erstellung der 2-D-Gele und die netten Kneipenabende. Last but not least herzlichen Dank an Dr. Claudia Simm und Dr. Thomas Maier für die sehr schöne Zeit im Labor und auch nach Feierabend.

Vielen Dank an Frau Regina Weiß für ihren unermüdlichen Einsatz beim Sequenzieren der sehr zahlreichen Proben.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Christina Maria Reitmaier. Großen Dank für Deine moralische Unterstützung an guten und vor allem schlechten Tagen, Deine fachlichen Anregungen und Deine Liebe. Danke Schnecke!

Und natürlich möchte ich mich bei meinen Eltern für all ihre Unterstützung und Liebe bedanken. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere ebenfalls, daß die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Halle, im November 2004

Michael Weber

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Vor- und Nachname: Michael Weber
Anschrift: Schillerstraße 11
06114 Halle (Saale)
e-mail: mweber@ipb-halle.de
Geburtsdatum: 28. Mai 1974
Geburtsort: Kulmbach
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980-1985 Volksschule Thurnau
1985-1994 Markgräfin-Wilhelmine-Gymnasium, Bayreuth
(musischer Zweig)
07/1994 Schulabschluß: Abitur

Wehrdienst

07/1994-06/1995 Wehrdienst beim Heeresmusikkorps 4 / Regensburg

Studium und Promotion

WS 1995/96-SS1997 Grundstudium Biologie, Universität Bayreuth
WS 1997/98-WS 1999/00 Hauptstudium Biologie, Universität Bayreuth, in den Fächern
Pflanzenphysiologie, Genetik, Biochemie
WS 1999/00-WS 2000/01 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie,
Universität Bayreuth, Prof. Dr. E. Beck
Thema: Entwicklung und Test eines Transformations-
systems für Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) unter
Verwendung von GFP
seit 03/2001 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie,
Abteilung Streß- und Entwicklungsbiologie, Halle (Saale),
Prof. Dr. D. Scheel
Thema: Identifizierung und Charakterisierung von Hyperakku-
mulationsfaktoren bzw. schwermetallregulierten Genen in
Arabidopsis halleri und *Arabidopsis thaliana*

Berufsbezogenes Praktikum

02/1999-05/1999 AG Gentransfer, IPK Gatersleben
Arbeitsgebiet: molekularbiologische und proteinbiochemische
Analyse transgener Pflanzen

Publikation

Weber *et al.*, Plant J. 2004 Jan; 37(2):269-81.