

Untersuchungen zur Metallhomöostase in
Arabidopsis thaliana

Toralf Senger

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Universität Potsdam

Angefertigt am MPI für molekulare Pflanzenphysiologie Golm.

Gutachter:

Prof. Dr. Mark Stitt
Prof. Dr. Rüdiger Hell
Prof. Dr. Stephan Clemens

Tag der Disputation: 13. April 2007

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.

Danksagung

ZUNÄCHST möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Ute Krämer für die Möglichkeit bedanken, in ihrer Arbeitsgruppe »Metallhomöostase« eine Doktorarbeit anfertigen zu können. Aufgrund der sehr interessanten Thematik hat mir die Arbeit viel Freude gemacht. Ihre engagierte Betreuung und insbesondere die Bereitschaft, auftretende Fragen zu jedem Zeitpunkt diskutieren, waren bei der täglichen Arbeit und insbesondere bei der Korrektur des Manuskripts von großer Hilfe. Vielen Dank an Prof. Dr. Mark Stitt und Dr. Rita Zrenner, die als Betreuer dieser Arbeit wertvolle Hinweise gaben. Neben Prof. Mark Stitt möchte ich Prof. Dr. Rüdiger Hell, PD Dr. Peter Dörmann und PD Dr. Stephan Clemens für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Allen Mitgliedern der AG Metallhomöostase in den letzten drei Jahren (Toni, Katrin, Juliane, Stéphanie, Len, Astrid, Marc, Ina, Andrea, Norman, Melly, Diana...) möchte für ihren Beitrag zu einer Arbeitsatmosphäre bedanken, die von Lockerheit und viel Spaß, aber auch von Interesse und Neugier an der Wissenschaft sowie interessanten Diskussionen geprägt war. Insbesondere Dr. Marc Hanikenne, Dr. Ina Talke und Dr. Leonard Krall und möchte ich für die vielen wertvollen Gespräche danken, die sich aus wissenschaftlichen Problemstellungen ergaben. Dr. Ina Talke danke ich darüber hinaus für die Einführung in die Thematik der Hydrokultur von Pflanzen.

Bei allen, die an diesem Institut bei so mancher Feier, Fahrradtour oder freitäglichen Kickerspielen zu Freunden geworden sind, möchte ich mich für den vielen Spaß bedanken, den wir zusammen hatten: Dirk, Berit, Maren, Fabien, Carsten, Björn, Janina, Gaele, Hélène und insbesondere Stéphanie (»Pfeffi«).

Schließlich möchte ich den wichtigsten Personen in meinem Leben danken: Meinem Vater und meiner Mutter – die leider so früh von uns gehen musste – und meiner Schwester Sigrun. An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Freundin Steffi bedanken, die in allen Lebenslagen ein fester und steter Halt ist – Danke auch für das Lesen und die Korrektur dieses Manuskripts.

Zusammenfassung

Alle Organismen sind für ihr Überleben auf Metalle angewiesen. Neben den Leichtmetallen Ca, K, Na und Mg haben eine Reihe von Schwermetallen der dritten Übergangsperiode (»Übergangsmetalle«) wie Mn, Fe, Ni, Cu und Zn eine essentielle Bedeutung in der Biologie. Sie werden z. B. als Kofaktoren von Enzymen oder als strukturell stabilisierende Komponenten in Proteinen benötigt. Eine unzureichende Verfügbarkeit dieser Metalle führt zu Mangelsymptomen, wohingegen die übermäßige Aufnahme toxisch wirkt. Letzteres gilt insbesondere für einige nicht-essentielle Metalle wie Hg und Pb. In Organismen gibt es für jedes Metall einen Konzentrationsbereich, der das Optimum zwischen Metallmangel, -bedarf und -toxizität darstellt. Es gilt mittlerweile als erwiesen, dass alle Organismen zur Aufrechterhaltung des Metallgleichgewichts ein komplexes Netzwerk von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen entwickelt haben. Hierzu zählen Systeme zur Aufnahme, zur Verteilung und zur Speicherung von Metallen, die auf zellulärer Ebene sowie auf der Ebene von Organen im gesamten Organismus operieren. Die molekularen Komponenten dieses Netzwerks sind nur zu einem Teil bekannt und charakterisiert: In den letzten Jahren wurden einige Proteinfamilien identifiziert, deren Mitglieder Metalle durch Lipidmembranen transportieren. Eine dieser Metalltransporterfamilien ist die *Cation Diffusion Facilitator* (CDF)-Familie: Alle charakterisierten Mitglieder exportieren Metalle aus dem Zytoplasma – entweder in zelluläre Kompartimente oder aus der Zelle heraus. Von den zwölf Mitgliedern dieser Familie in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) – Metall Toleranz Protein (MTP)-1 bis -12 – wurden bisher *AtMTP1* und *AtMTP3* charakterisiert. In dieser Arbeit wird die Charakterisierung von *AtMTP2* beschrieben. Wie die homologen Proteine *AtMTP1* und *AtMTP3* führt *AtMTP2* zu Zn-Toleranz, wenn es heterolog in Zn-sensitiven Hefemutanten exprimiert wird. Mit *AtMTP2* transformierte Hefemutanten zeigten darüber hinaus erhöhte Co-Toleranz und sehr leicht erhöhte Fe-Toleranz. *AtMTP2* in Fusion mit *Enhanced Green Fluorescing Protein* (EGFP) scheint in Hefe, in *A. thaliana*-Protoplasten und in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen in Membranen von Vakuolen und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert zu sein. Dies legt nahe, dass *AtMTP2* die erwähnten Metalle in das Endomembransystem der Zelle transportieren kann. Eine gewebespezifische Lokalisierung wurde mit Pflanzen durchgeführt, die das β -Glucuronidase (GUS)-Reporterprotein bzw. chimäre Fusionsproteine aus EGFP und *AtMTP2* unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors exprimierten. Diese Experimente bestätigten zum einen, dass der *pMTP2*-Promotor nur unter Zn-Defizienz aktiv ist. GUS-Aktivität wurde unter diesen Bedingungen in zwei Zonen der Wurzelspitze beobachtet:

in den isodiametrischen Zellen der meristematischen Zone und in der beginnenden Wurzelhaarzone. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die EGFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors nur in epidermalen Zellen exprimiert werden. Für eine homozygote *Knock-out*-Linie, *mtp2-S3*, konnte bisher kein eindeutiger Phänotyp identifiziert werden. Auf Grundlage der bisher durchgeführten Charakterisierung von *AtMTP2* erscheinen zwei Modelle der Funktion von *AtMTP2* in der Pflanze möglich: *AtMTP2* könnte essentiell für die Versorgung des Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Zn unter Zn-Mangelbedingungen sein. Hierfür spricht, dass *AtMTP2* in jungen, teilungsaktiven und damit Zn-benötigenden Wurzelzonen exprimiert wird. Die auf die Epidermis beschränkte Lokalisation könnte bei diesem Modell auf die Möglichkeit der zwischenzellulären Zn-Verteilung innerhalb des ER über Desmotubules hindeuten. Alternativ könnte *AtMTP2* eine Funktion bei der Detoxifizierung von Zn unter Zn-Schock Bedingungen haben: Es ist bekannt, dass unter Zn-Mangelbedingungen die Expression der zellulären Zn-Aufnahmesysteme hochreguliert wird. Wenn nun die Zn-Verfügbarkeit im Boden z. B. durch eine pH-Änderung innerhalb kurzer Zeit stark ansteigt, besteht die Notwendigkeit der Entgiftung von Zn innerhalb der Zelle, bis der starke Einstrom von Zn ins Zytoplasma durch die Deaktivierung der Zn-Aufnahmesysteme und einer geringeren Expression in der Pflanze gedrosselt ist. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beschrieben, in der darüber hinaus ein Zn-Transporter verstärkt exprimiert wird, der Zn durch Transport in die Vakuole entgiften kann. Es ist durchaus möglich, dass in *Arabidopsis AtMTP2* die Zn-Detoxifizierung unter diesen speziellen Bedingungen durch Zn-Transport in das ER oder die Vakuole vermittelt.

Zur Identifikation weiterer Komponenten des Metallhomöostasenetzwerks sind verschiedene Ansätze denkbar. In dieser Arbeit wurde in Hefe ein heterologer Screen durchgeführt, um Interaktoren für vier Mitglieder der *Arabidopsis*-CDF-Familie zu identifizieren. Unter den 11 im Hefesystem bestätigten Kandidaten befindet sich mit *AtSPL1* ein *AtMTP1*-Interaktionskandidat, der möglicherweise eine Rolle bei der Cu-,Zn-Homöostase spielt. Als wahrscheinliche *AtMTP3*-Interaktionskandidaten wurde die c"-Untereinheit der vakuolären H⁺-ATPase *AtVHA* identifiziert sowie mit *AtNPSN13* ein Protein, das vermutlich eine Rolle bei Fusionen von Vesikeln mit Zielmembranen spielt.

Ein anderer Ansatz zur Identifikation neuer Metallhomöostasegene ist die vergleichende Elementanalyse von natürlichen oder mutagenisierten Pflanzenpopulationen. Voraussetzung für diesen Ansatz ist die schnelle und genaue Analyse des Elementgehalts von Pflanzen. Eine etablierte Methode zur simultanen Bestimmung von bis zu 65 Elementen in einer Probe ist die *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (ICP OES). Der limitierende Faktor für einen hohen Probendurchsatz ist die Notwendigkeit, Proben für die Analyse zu verflüssigen. Eine alternative Methode der Probenzuführung zum Analysegerät ist die elektrothermale Verdampfung (ETV) der Probe. Zur weitgehend automatisierten Analyse von Pflanzenmaterial mit minimiertem Arbeitsaufwand wurde eine Methode entwickelt, die auf der Kopplung der ETV mit der ICP OES basiert.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Zusammenfassung	VII
Abbildungsverzeichnis	XIV
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVII
1 Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Übergangsmetalle in der Biologie	1
1.2 Metall-Transport-Systeme	3
1.2.1 ABC-Transporter	5
1.2.2 Metall-Aufnahmesysteme	5
1.2.3 Metall-Exportsysteme	7
1.3 Screen auf Interaktoren für Mitglieder der CDF-Familie	11
1.4 Analyse der elementaren Zusammensetzung von Pflanzen im Hochdurchsatz	15
1.4.1 Atomspektrometrie zur Elementanalyse	16
1.4.2 Funktionsprinzip der ICP OES	17
2 Material und Methoden	21
2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.1.1 Standardmethoden	21
2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.1.3 Homologe Rekombination in Hefe	22
2.1.4 Plasmidisolierung aus Hefe	22
2.1.5 Isolierung der cDNA der Interaktionskandidaten aus Hefe; Retransformation von Hefe	23
2.1.6 <i>Rapid Amplification of cDNA-Sequences</i> (RACE)	23
2.1.7 Klonierung von <i>AtAKT1</i>	24
2.1.8 Klonierung von <i>AtMTP1</i>	24
2.1.9 Klonierung von <i>AbMTP1</i>	25
2.1.10 Klonierung von <i>AtMTP2</i>	25
2.1.11 Klonierung von <i>AtMTP3</i>	25
2.1.12 Klonierung von <i>AtMTP12</i>	25
2.1.13 Klonierung der Interaktionskandidaten	26

2.1.14	<i>Southern Blot</i> der <i>mtp2-S3</i> -Linie	26
2.2	Hefe-Vektoren, Klonierungen	27
2.2.1	N _{Ub} / <i>Prey</i> -Vektoren	27
2.2.2	C _{Ub} / <i>Bait</i> -Vektor	29
2.2.3	Hefe-Expressionsvektoren	29
2.3	Pflanzen-Expressionsvektoren, Klonierungen	31
2.4	Proteinchemische Methoden	33
2.4.1	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.4.2	Silberfärbung von Proteingelen	33
2.4.3	Western Blot	33
2.5	Hefe-Experimente	34
2.5.1	Verwendete Stämme	34
2.5.2	Aminosäuremix	34
2.5.3	Transformation von Hefe	35
2.5.4	Tropfentest-Experimente	36
2.5.5	Screen mit dem <i>Split Ubiquitin System</i>	37
2.6	Analyse transgener Pflanzen	37
2.6.1	Pflanzenmaterial und Transformation	37
2.6.2	Oberflächen-Sterilisation von Samen	37
2.6.3	Wachstumsbedingungen	37
2.6.4	Charakterisierung von homozygoten transgenen Linien	39
2.6.5	Bestimmung der Elementgehalte in Pflanzen mittels ICP OES	40
2.6.6	Konfokalmikroskopie	40
2.6.7	Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität durch histochemische Färbung	40
2.6.8	Fluorimetrische GUS-Bestimmung	41
2.7	Transformation von <i>A. thaliana</i> -Protoplasten	41
2.8	Kopplung der ETV mit der ICP OES	42
3	Resultate Teil A: Interaktionsscreen für Mitglieder der CDF-Familie	43
3.1	Vorexperimente zur Etablierung des SUS für Screens	43
3.2	Interaktionsscreen mit dem SUS in Hefe	48
3.3	Überprüfung der Kandidaten	50
3.3.1	Untersuchung der Kandidaten in anderen Varianten des SUS	52
3.3.2	Einfluss der Kandidaten auf die Zn-Homöostase in Hefe	53
3.4	Biochemische Experimente zur Identifikation von <i>AtMTP3</i> -Interaktoren	55
4	Resultate Teil B: Charakterisierung von <i>AtMTP2</i> und <i>AtMTP12</i>	57
4.1	Funktionelle Charakterisierung von <i>AtMTP12</i>	57
4.1.1	5'-RACE und Klonierung von <i>AtMTP12</i>	57
4.1.2	Heterologe Expression von <i>AtMTP12</i> in verschiedenen Hefemutanten	59
4.2	Funktionelle Charakterisierung von <i>AtMTP2</i>	59
4.2.1	Heterologe Expression von <i>AtMTP2</i> in verschiedenen Hefemutanten	60
4.2.2	Promotor:: <i>GUS</i> Analysen von <i>AtMTP2</i>	61
4.2.3	Vergleichende Promotor:: <i>GUS</i> -Analysen von <i>AtMTP1</i> , -2 und -3	65

4.2.4	Zelluläre Lokalisation des Proteins	68
4.2.5	Genotypisierung der <i>A. thaliana mtp2-S3</i> -Mutante	73
4.2.6	Phänotypisierung der <i>A. thaliana mtp2-S3</i> -Mutante	76
4.2.7	Elementgehalt der <i>mtp2-S3</i> -Mutante im Vergleich zum Wildtyp	84
4.2.8	Komplementation und Bestätigung eines Phänotyps der <i>mtp2-S3</i> -Mutante	85
4.2.9	Charakterisierung von <i>p35S::AtMTP2</i> Pflanzen	85
5	Resultate Teil C: ETV ICP-OES basierte Screeningmethode	89
5.1	Kopplung des ETV Gerätes mit der ICP-OES	89
5.1.1	Problemstellung	89
5.2	Entwicklung einer Analysemethode für Pflanzenmaterial	91
5.2.1	Wahl geeigneter Emissionslinien zur Elementbestimmung	91
5.2.2	ETV-Programm zur Verdampfung und Analyse von getrocknetem Pflanzenmaterial	93
5.2.3	Methodik zur automatisierten Messung von fünfzig Proben	100
5.3	Erweiterung für Origin® v7.0 und v7.5	100
5.3.1	Funktionalität	100
5.3.2	Vergleich des Elementgehalts von Samen von 35 <i>Arabidopsis</i> -Ökotypen	106
6	Diskussion	109
6.1	Interaktionsscreen	109
6.1.1	Prinzipieller Test des SUS	109
6.1.2	Identifikation von Interaktoren für <i>AtMTP1, -2 und -3</i>	110
6.1.3	Die Stärke der Interaktion konnte nicht bestimmt werden	110
6.1.4	Einfluss der CDF-Interaktionskandidaten auf die Zn-Homöostase in Hefe	112
6.1.5	Verknüpfung der Ergebnisse des Screens mit Literaturdaten und <i>in silico</i> Analyse	113
6.1.5.1	Putative <i>AtMTP1</i> Interaktoren	115
6.1.5.2	Putative <i>AbMTP1</i> Interaktoren	118
6.1.5.3	Der putative <i>AtMTP2</i> Interaktor...	119
6.1.5.4	Putative <i>AtMTP3</i> Interaktoren	119
6.1.6	Zukünftige Experimente im Rahmen des Interaktionsscreens	123
6.2	<i>AtMTP12</i> kodiert ein atypisches CDF-Protein	125
6.3	<i>AtMTP2</i> ist im Endomembransystem der Zelle lokalisiert und vermittelt in Hefe Zn- und Co-Detoxifizierung	127
6.4	<i>AtMTP1, -2 und -3</i> erfüllen spezifische Funktionen in der Wurzel der Pflanze.	130
6.5	Zukünftige Experimente im Rahmen der Charakterisierung von <i>AtMTP2</i>	136
6.6	Die ETV-Kopplung mit der ICP OES eignet sich als Hochdurchsatzmethode	140
	Literaturverzeichnis	xxi
A	Anhang	A
A.1	Sequenzen von <i>AtMTP2</i> und <i>AtMTP12</i> , Primerbindungsstellen	A
A.1.1	<i>AtMTP2</i> (At3g61940): ORF, Primer, Aminosäuresequenz	A
A.1.2	<i>AtMTP12</i> (At2g04620): ORF, Primer, Aminosäuresequenz	B

A.1.3	Primer für die Klonierung der Interaktionskandidaten	E
A.2	N_{Ub} -Vektoren: <i>Linker</i> -Sequenzen zwischen (N_{Ub}) und cDNA	F
A.3	CDFs von Hefe, Mensch und <i>Arabidopsis</i> : Phylogenetischer Baum	H
B	Lebenlauf	I

Abbildungsverzeichnis

1.1	Phylogenetischer Baum der CDF-Familie	9
1.2	Das <i>Split Ubiquitin System</i> (SUS)	15
3.1	Präsenz von <i>AtMTP1</i> , <i>AtMTP2</i> und <i>AtMTP3</i> in den Split Ubiquitin Bibliotheken	43
3.2	Funktion der MTPs als C _{Ub} -Fusionsproteine	44
3.3	Funktion der MTPs als N _{UbA} Fusionsproteine und Cu-Abhängigkeit der Komple- mentation	45
3.4	Test des SUS mit Interaktionskontrollen	46
3.5	Tropfentest mit positiven und negativen Kontrollen sowie einigen Interaktionskan- didaten zum Test des SUS	47
3.6	Unterschied zwischen <i>Escapes</i> und tatsächlichem Wachstum auf 5-FOA-Medium	47
3.7	Übersicht über den Screen	49
3.8	Tropfentest zur Bestätigung der im Screen identifizierten Kandidaten im SUS	50
3.9	Einfluss unterschiedlicher N _{UbT} -Vektoren auf das Ergebnis des Interaktionstest im SUS	53
3.10	Einfluss der Kandidaten auf die Zn-Homöostase in <i>zrc1 cot1</i>	54
3.11	Identifizierung von höhermolekularen Proteinkomplexen durch Blue Native PAGE	55
4.1	Länge des <i>AtMTP12</i> ORF und Hydrophobizitätsplot des kodierten Proteins	57
4.2	5'-RACE mit <i>AtMTP12</i>	58
4.3	Hydrophobizitätsplot von <i>AtMTP2</i>	59
4.4	Heterologe Expression von <i>AtMTP2</i> in Hefemutanten	60
4.5	<i>AtMTP2</i> komplementiert nicht die UPR von <i>msc2</i>	61
4.6	Analyse von <i>pAtMTP2::GUS</i> -Linien auf Agarosemedien	62
4.7	Analyse von <i>AtMTP2::GUS</i> -Linien in Hydrokultur	63
4.8	Zn-Abhängigkeit der Promotoraktivität von <i>AtMTP1</i> , -2 und -3 in Keimlingen	66
4.9	Lokalisierung der Promotoraktivität von <i>AtMTP1</i> , -2 und -3 in Keimlingen	66
4.10	Anatomie der <i>Arabidopsis</i> -Wurzel	67
4.11	Promotoraktivität von <i>AtMTP1</i> , -2 und -3 in Keimlingen: MUG- <i>Assay</i>	68
4.12	Lokalisierung von <i>AtMTP2</i> als chimäres EGFP-Fusionsprotein in Hefe und in <i>A. thal-</i> <i>iana</i> Protoplasten	69
4.13	Zelluläre Lokalisierung von <i>AtMTP2</i> als chimäres EGFP-Fusionsprotein in stabilen <i>A. thaliana</i> -Transformanten	71
4.14	3D Rekonstruktion von Vakuolen zweier Wurzelzellen, die MTP2-EGFP exprimieren	72
4.15	Test auf Homozygotie der T-DNA-Mutante <i>mtp2-S3</i>	74
4.16	Daten der AG D. Salt: <i>Southern Blots</i> , <i>Northern Blots</i> und RT-PCR von <i>mtp2-S3</i>	75
4.17	<i>Southern Blot</i> von Individuen der T ₅ -Generation der <i>mtp2-S3</i> -Linie	75
4.18	Schematische Darstellung der T-DNA-Insertion in <i>mtp2-S3</i>	76

4.19	Wurzelwachstum von <i>mtp2-S3</i> und Wildtyp unter Zn-Schock-Bedingungen	78
4.20	Relative Wurzelverlängerung von <i>mtp2-S3</i> unter Zn-Schock-Bedingungen	79
4.21	Wdh.: Wurzelwachstum von <i>mtp2-S3</i> und Wildtyp unter Zn-Schock-Bedingungen .	80
4.22	Wurzelwachstum von <i>mtp2-S3</i> und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn	81
4.23	Wdh.: Wurzelwachstum von <i>mtp2-S3</i> und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn	82
4.24	Zusammenfassung aller Experimente: Wurzelwachstum von <i>mtp2-S3</i> und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn	83
4.25	Elementgehalte in <i>mtp2-S3</i> und Col-0 mittels ICP OES	86
4.26	Rückkreuzung von <i>mtp2-S3</i> mit dem Wildtyp	88
4.27	Relative <i>AtMTP2</i> -Transkriptmengen in <i>A. thaliana-p35S::MTP2</i> -Linien	88
5.1	Gerätetechnik der ETV-ICP OES	89
5.2	Multiple transiente Signale für Schwefel bei der Verdampfung von Pflanzenmaterial .	95
5.3	Das Verdampfungsprofil von Schwefel ist abhängig vom Pflanzenmaterial.	96
5.4	Artefakt-Signale für Cu und Ca bei der Verdampfung von Pflanzenmaterial	97
5.6	Timescanbug der TEVA-Software	98
5.5	Detektionszeiten der Elemente bei der Verdampfung von Pflanzenmaterial	99
5.7	Kalibration der ETV-Methode mit CRM	104
5.8	Elementgehalte in <i>Arabidopsis</i> -Ökotypen	107
A.1	Phylogenetischer Baum der CDFs von Hefe, Mensch und <i>Arabidopsis</i>	H

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht über alle mit dem SUS durchgeführten Screens	48
3.2	Putative Interaktoren für <i>AtMTP1</i> , <i>AbMTP1</i> , <i>AtMTP2</i> und <i>AtMTP3</i>	51
3.3	Übersicht über die Kandidaten: <i>in silico</i> Analyse und Klonierungen.	56
4.1	<i>Southern Blots</i> von Individuen der <i>mpt2-S3</i> -Linie	75
4.2	Bestimmung der Zn-Kontaminationen in HOAG-Medien mittels ICP OES	84
5.1	Emissionslinien für die Quantifizierung von Elementen in Pflanzenmaterial	93
5.2	Vergleich der Probenanalyse durch ETV-ICP OES mit der ICP OES-Analyse nach Säureaufschluss	108

Abkürzungsverzeichnis

ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center Stocks</i>
Agrobacterium	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A. thaliana	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A. halleri	<i>Arabidopsis halleri</i>
AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CID	<i>Charge Injection Device</i>
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i>
C_{ub}	Aminosäuren 35–75 von Ubiquitin
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
CRM	<i>Certified Reference Material</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
DAPI	4',6 Diamidino-2-Phenylindol
DAS	<i>Days After Sowing</i> – Tage nach Aussaat
DAT	<i>Days After Transfer</i> – Tage nach Transfer
DCArc-OES	<i>Direct Current Arc Optical Emission Spectrometry</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescing Protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ET AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry with Electrothermal Vaporisation</i>
ETV	elektrothermale Verdampfung
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethanmethylsulfonat
F AAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
F AES	<i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i>
5-FOA	5-Fluororotsäure
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GUS	β -Glucuronidase
HA	<i>Haemagglutinin</i>
HOAG	$\frac{1}{4}$ -konzentriertes <i>Hoagland</i> Medium (Hoagland und Arnon, 1938)
HEDTA	Hydroxyethylenediamin-Triessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure
HBED	N,N'-Bis(2-Hydroxybenzyl)ethylendiamin-N,N'-Diessigsäure
ICP OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LiAc	Lithiumacetat
LFSE	Ligandenfeldstabilisierungsenergie
LZM	<i>Low Zinc Medium</i>
LSP	<i>Low Sulphate/Phosphate Medium</i>
MIPS	<i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>
MPSS	<i>Massively Parallel Signature Sequencing</i>
MS	<i>Murashige Skoog</i> Medium (Murashige und Skoog, 1962)
MTP	Metall Toleranz Protein; pflanzliches CDF Protein
MU	7-Hydroxy-4-Methylcoumarin
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
NaAc	Natriumacetat

NASC	<i>The European Arabidopsis Stock Centre</i>
NBT	Natriumnitrotetrazoliumblau
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
N_{Ub}	Aminosäure 1–34 von Ubiquitin
N_{UbA}	Aminosäure 1–34 von Ubiquitin; I ₁₃ A-Mutante
N_{UbG}	Aminosäure 1–34 von Ubiquitin; I ₁₃ G-Mutante
N_{Ubi}	Aminosäure 1–34 von Ubiquitin; Wildtyp
OES	<i>Optical Emission Spectrometry</i>
OD₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PEG	Polyethylenglycol
PGK1	<i>Phosphoglyceratkinase 1</i>
ppm	<i>parts per million</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci /Locus</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA-Sequences</i>
RF	<i>Radio Frequency</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SC	<i>Supplement Complete</i> oder <i>Synthetic Complete</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Supplement Deficient</i> oder <i>Synthetic Dextrose</i> (Hefemedium); je nach Kontext auch <i>Standard Deviation</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SS ET AAS	<i>Solid Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>
SNARE	<i>soluble N-ethyl-maleimid sensitive factor attachment protein receptor</i>
SUS	<i>Split Ubiquitin System</i>
SVM	<i>Support Vector Machine</i>

TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolglucuronid
yEGFP	<i>Yeast Enhanced Green Fluorescing Protein</i> (Cormack <i>et al.</i> , 1997)
Y2H	<i>Yeast two Hybrid</i>
ZIP	<i>Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter-like Protein</i>

1 Einleitung

In den folgenden Abschnitten wird zunächst auf die Bedeutung der Übergangsmetalle in der Biologie eingegangen. Wichtige Komponenten zur Aufrechterhaltung der »Metallhomöostase« sind Membranproteine, die als Transporter für diese Metalle dienen. Um die Charakterisierung eines dieser Transporter, *AtMTP2*, in der Diskussion in den Kontext der bekannten Transporter der Pflanze zu stellen, werden die identifizierten bzw. vermuteten Funktionen der bekannten Übergangsmetalltransporter kurz beschrieben. Im letzten Teil der Einführung wird auf die Problematik der Quantifizierung von Elementen in organischen und anorganischen Proben sowie auf die hier vorgestellte verbesserte Methode zur vereinfachten und schnelleren Analyse von organischem Material eingegangen.

1.1 Bedeutung der Übergangsmetalle in der Biologie

Neben den Hauptgruppenelementen Na, Mg (dritte Periode¹) sowie K und Ca (vierte Periode) gewannen im Zuge der Evolution Metalle der dritten Übergangsperiode (Sc bis Zn) an Bedeutung. Außer den ersten beiden Elementen Sc und Ti wurden für alle weiteren Elemente der dritten Übergangsperiode (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) Funktionen in der Biologie identifiziert (Holleman *et al.*, 1995; Marschner, 1995). Diese Elemente sind dadurch charakterisiert, dass mit zunehmender Ordnungszahl die zweitäußerste Elektronenschale (3d-Orbital) ausgebaut wird, nachdem bereits die äußerste Elektronenschale (4s-Orbital) durch Elektronen besetzt wurde (K und Ca). Da nur die äußerste Schale entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften eines Atoms hat, unterscheiden sich die Elemente der Übergangsperioden nicht so charakteristisch voneinander wie die Hauptgruppenelemente. Neben der Tatsache, dass *alle* Elemente der Übergangsperioden Metalle sind, erkennt man das im Fall der erwähnten Elemente z. B. an den fast identischen Atomradien ($r_{\text{Atom}} = 1,26\text{--}1,37\text{Å}$) und daran, dass sie aufgrund der Anwesenheit von zwei Elektronen in der äußersten Schale imstande sind zweiwertig aufzutreten.² Grob vereinfacht ausgedrückt ist hierdurch eine Feineinstellung der Zellchemie

¹im Langperiodensystem der Elemente

²Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen (z. B. Eisen oder Fe) beziehen sich auf die biologisch relevante oxidierte Form der Elemente. Nur in biologisch relevanten Fällen wird der Oxidationsstatus explizit angegeben (z. B. Fe(III)/Fe(II); Fe³⁺/Fe²⁺ bezieht sich auf das frei hydratisierte Ion.)

möglich, die überwiegend durch die Hauptgruppenelemente C, N, O, P, S und Cl definiert ist.³ Andererseits birgt die chemische Ähnlichkeit innerhalb eines Großteils der Übergangsmetalle die Gefahr, dass Metall einander in Verbindungskomplexen ersetzen können.⁴ Neben dem Ionenradius, der für die (II)-wertigen Ionen mit steigender Ordnungszahl (Kernladung) abnimmt, hat hauptsächlich die Ligandenfeldstabilisierungsenergie (LFSE) Einfluss auf die Stabilität der Metallionen-Komplexe (Holleman *et al.*, 1995). Hierin liegt die Begründung für die Beobachtung, dass die Stabilität von Komplexen der Metalle mit O, S und N-haltigen Liganden in der *Irving-Williams-Reihe* zunimmt:⁵ $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Die Bildung von Komplexen ist die herausragende Eigenschaft der Übergangsmetalle. Betrachtet als *Lewis-Säure/Base-Reaktion* ist die Komplexbildung die Reaktion eines *Lewis-sauren* Metall-Komplexzentrums mit *Lewis-basischen* Liganden (Elektronendonoren), wie S, N oder O. Als Zentralatom der Komplexe sind die Elemente der dritten Übergangsperiode ist dabei bestrebt, die Elektronenkonfiguration von Krypton zu erlangen ($3d^{10}4s^24p^6$; »18-Elektronen-Regel«). Die Tatsache, dass diese Metalle häufig im aktiven Zentrum von Enzymen als prosthetische Gruppe gefunden werden, liegt an der Eigenschaft der Metalle, Bindungen der Ligandmoleküle zu polarisieren und damit deren Aufbrechen zu erleichtern. Wichtig ist hierbei, dass die Substitution von gleichen Ligandmolekülen – von einigen biologisch nicht relevanten Ausnahmen⁶ abgesehen – für fast alle biologisch relevanten Metalle schnell (Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ des H_2O Austauschs für $\text{Fe}^{3+} \approx 10^{-2}$ s) bis sehr schnell erfolgt ($\tau_{1/2}$ der Aquakomplexe für Fe^{2+} , $\text{Co}^{2+} \approx 10^{-6}$ s; für Zn^{2+} , $\text{Mn}^{2+} \approx 10^{-7}$ s; für $\text{Cu}^{2+} \approx 10^{-9}$ s) (Holleman *et al.*, 1995). Die Austauschgeschwindigkeit der H_2O -Liganden ist für Cu^{2+} fast diffusionslimitiert und übertrifft die Ligand-Austauschgeschwindigkeit des in vielen Organismen als Signal-Ions eingesetzten Ca^{2+} ($\tau_{1/2} \approx 10^{-8,2}$ s). Für die Katalyse von Redox-Reaktionen ist ausschlaggebend, dass mit Ausnahme von Zn alle Metalle der dritten Übergangsgruppe in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen können. Aufgrund der günstigen Konfiguration der Ligandengeometrie für $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ sowie $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ werden in Enzymen, die Redox-Reaktionen katalysieren, zumeist Fe und Cu gefunden. Zn wird häufig als strukturell stabilisierende Komponente in Proteinen gefunden, wobei durch Zn Liganden von verschiedenen Aminosäureresten gebunden werden. Im Zuge der Evolution wurde Zn hierfür aus zwei Gründen ausgewählt. Erstens tritt es als einziges Element der biologisch wichtigen Übergangsmetalle nur in einer einzigen Oxidationsstufe (II) auf, wodurch keine Gefahr der Katalyse unerwünschter Redox-Reaktionen durch dieses Metall besteht. Zweitens kann es als mittelharte *Lewis-Säure* starke Komplexverbindungen sowohl mit harten Basen (z. B. O-Donoren) und mittelharten

³Andere essentielle Hauptgruppenelemente sind: B (in Pflanzen), F, As, Se, Sn, I. Essentielle Nebengruppenelemente sind die im Text erwähnten (dritte Übergangsperiode) sowie Cd (Lane *et al.*, 2005) und Mo (vierte Übergangsperiode).

⁴Ähnlich zu den Metallen der dritten Übergangsperiode ist auch Cd (vierte Übergangsperiode) und das Hauptgruppenelement Pb.

⁵Die Hydratisierungsenergie von Mg^{2+} (Ordnungszahl 25) liegt auf einer Geraden mit Ca^{2+} und Zn^{2+} (Ordnungszahl 20 und 30). Dazwischen (Ordnungszahl 20–25, 25–30) steigt und fällt die Hydratisierungsenergie kontinuierlich aber nichtlinear.

⁶z. B. Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ des H_2O Austauschs für den Aqua-Komplex von $\text{Cr}^{3+} \approx 10^7$ s

Basen (z. B. N-Donoren) als auch mit weichen Basen (z. B. S-Donoren) eingehen.

Einerseits sind die Metalle notwendig für die auf ihren erwähnten chemischen Eigenschaften beruhenden biologischen Funktionen, andererseits kann eine Störung des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Metallen im Organismus toxische Auswirkungen haben. Bei Pflanzen führt Metalltoxizität aufgrund zu hoher Metallkonzentrationen im Wachstumsmedium generell zu einem beeinträchtigten Wachstum (Marschner, 1995). Die toxische Wirkung der Metalle ist zum einen der Redox-aktiven Wirkung der meisten Übergangsmetalle zuzuschreiben, die aufgrund unkontrollierter Redox-Reaktionen zu oxidativem Stress führen kann (Pinto *et al.*, 2003; Marschner, 1995). Zum anderen kann die Metalltoxizität zur unerwünschten Substitution von Metallen in Proteinen führen: Eine solche Substitution von Metallen, die für die Funktion eines Proteins unerlässlich sind, durch andere, die diese biologische Funktion nicht übernehmen können, kann ernsthafte Auswirkungen auf den Organismus haben. Substitution solcher essentieller Metalle durch chemisch ähnliche nicht-essentielle Metalle, wie Cd⁷, Pb und Hg, hat generell einen toxischen Effekt. Aber auch die Substitution eines essentiellen Metalls durch ein anderes essentielles Metall hat oft ähnlich toxische Auswirkungen (z. B. durch Zn-verursachte Chlorose, s. Marschner, 1995). Die Notwendigkeit der Metalle sowie deren konzentrationsabhängige Toxizität führten in Pflanzen, wie auch in allen anderen höheren Organismen, zur Entwicklung eines komplexen Netzwerks der Metallhomöostase, das die Konzentration jedes Metalls im Organismus in einem relativ engen Bereich hält (Metallhomöostasennetzwerk, Überblick in Zenk, 1996; Nelson, 1999; Eide, 2000; Clemens, 2001; Hall, 2002; Finney und O'Halloran, 2003; Hall und Williams, 2003; Krämer und Clemens, 2005; Colangelo und Guerinot, 2006). Komponenten dieses Netzwerks sind Metalloproteine, Metalltransportproteine, Chelatoren wie Metallothionein, Phytochelatine, Histidin, Nicotianamin und die hieraus gebildeten Phytosiderophoren. Die unspezifische Bindung von Metallen, z. B. an die Zellwand und an Membranoberflächen macht diese Bindungsstellen indirekt ebenfalls zum Teil des Netzwerks.

1.2 Metall-Transport-Systeme

Eine essentielle Rolle bei der Verteilung der Übergangsmetalle im Organismus und bei der Aufrechterhaltung der Metallhomöostase spielen Metalltransportproteine, die in den Membranen praktisch aller Organismen nachgewiesen oder durch Sequenzanalyse vorhergesagt wurden. Beim Menschen können Defekte in Metalltransportern zu ernsthaften Krankheiten führen, wie Menke's- oder Wilson-Syndrom im Fall von nicht funktionalen Cu-transportierenden ATPasen (Petrukhin *et al.*, 1994; Petris *et al.*, 2002). Auch für Mutationen die Mitglieder anderer Metalltransporterfamilien betrifft wurden ähnlich ernsthafte Auswirkungen beobachtet. So wurde im Fall des *Knockout* des *ZnT4* Genes, welches

⁷Cd wurde kürzlich als Cofaktor der *Carbonic Anhydrase* einer Kieselalge identifiziert (Lane *et al.*, 2005)

bei Mäusen einen Zn-spezifischen CDF kodiert, das Tödliche-Milch-Syndrom beschrieben (Huang und Gitschier, 1997). Pflanzen sind wie alle Organismen auf die erwähnten Übergangsmetalle der dritten Periode sowie auf Mo angewiesen. Die kontrollierte Aufnahme dieser Metalle aus dem Boden – unter Überwindung der ansonsten für Ionen undurchlässigen Membranbarriere – geschieht ebenfalls durch Transportproteine. Als sesshafte Organismen müssen Pflanzen in der Lage sein, bei temporal und spatial extrem unterschiedlichen bioverfügbaren⁸ Metallkonzentrationen im Boden die Aufnahme der richtigen Menge jedes essentiellen Metalls zu gewährleisten: Neben den gegebenen geologischen Bedingungen hängt die Bioverfügbarkeit der Metalle von Parametern wie dem pH-Wert, dem Feuchtigkeitsgrad und der Temperatur des Bodens ab, die zu starken temporalen Änderungen führen können. Das Wachstum der Wurzel durch Zonen mit verschiedenen bioverfügbaren Metallkonzentrationen ist eine weitere Herausforderung für die Pflanze (Krämer und Clemens, 2005). Die Spezifität der Transporter für die verschiedenen Übergangsmetalle scheint z. T. Beschränkungen zu unterliegen, wodurch in einigen Fällen neben dem erwünschten Metall auch unerwünschte Metalle durch einige dieser Transporter aufgenommen werden. So kann auch Cd als Substrat für einige Zn-Transporter dienen (Clemens *et al.*, 2002; Pence *et al.*, 2000). Dass einige Zn-Hyperakkumulatoren wie *Thlaspi caerulescens* und *Arabidopsis halleri* (*A. halleri*) auch Cd hyperakkumulieren (Cosio *et al.*, 2004; Zha *et al.*, 2004; Ebbs *et al.*, 1997), geht aber nicht notwendigerweise auf die duale Substratspezifität der Aufnahme-Systeme zurück. Ein Beispiel für die Existenz solcher Transporter mit einem breitem Substratspektrum ist allerdings IRT1: Neben seiner Funktion als Haupt-Aufnahmesystem für Fe dienen diesem Transporter der *Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter-like Protein* (ZIP)-Familie auch Zn, Mn und Cd als Substrat (Korshunova *et al.*, 1999). Möglicherweise aufgrund des breiten Substratspektrums wird dieser Transporter komplex reguliert: Regulation der Transkriptmenge erfolgt in Abhängigkeit von der Zn-, Cd-, Fe-Konzentration (Connolly *et al.*, 2002). Zudem wurde unterschiedliche posttranskriptionale Regulation durch Fe und Zn beobachtet. Die Substratspezifität und die Regulation von IRT1 können somit die Beobachtung erklären, dass Zn-Überschuss sekundär zu Fe-Defizienz führte (Connolly *et al.*, 2002).

In den folgenden Abschnitten wird ein kurzer Überblick über die bisher identifizierten Familien der Metalltransportproteine gegeben. Die hierbei vorgenommene Unterteilung in Aufnahme- und Exportsysteme bezieht sich auf die Richtung des Transports bezüglich des Zytoplasmas der Zelle. Für Metall-transportierende ABC-Transporter wurde diese Aufteilung nicht vorgenommen, da hierfür zu wenig bekannt ist.

⁸»Bioverfügbar« bedeutet »aufnehmbar« durch die Wurzel der Pflanze.

1.2.1 *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter

Mit fast 130 Mitgliedern allein in *Arabidopsis* ist die ABC-Transporter-Familie eine der Größten in allen drei Reichen des Lebens (Garcia *et al.*, 2004; Sánchez-Fernández *et al.*, 2001). Man unterscheidet bei den Mitgliedern dieser Superfamilie zwischen »*half-size*« und »*full-size*« Transportern, die über ein bzw. zwei Kopien einer zytoplasmatischen Nukleotid-Bindungsstelle verfügen, die jeweils gepaart ist mit einer stark hydrophoben Domäne, bestehend aus vier bis sechs Transmembranhelices (Holland *et al.*, 2003). Die Mitglieder der sieben Unterfamilien transportieren ein breites Substratspektrum inkl. Lipiden, Zuckern, Peptiden, Pigmenten, Antibiotika, Xenobiotika und Ionen, wobei die Energie für den Transport durch ATP-Hydrolyse gewonnen wird. Metalltransport wird für Mitglieder der Unterfamilie der *Multidrug resistance associated proteins* (MRP), der *heavy metal tolerance factor* (HMT)/*ABC transporter of mitochondria* (ATM) und der *pleiotropic drug resistance* (PDR)-Transporter gefunden. Für *AtMRP3*, einem von 14 *Arabidopsis* MRPs, wurde gezeigt, dass er die Cd-Sensitivität der *ycf1* Hefemutante komplementiert (Tommasini *et al.*, 1998). *ScYcf1* ist ein Protein der Vakuolenmembran, für das Transport von Bis-Gluthationato-Cadmium-Komplexen vom Zytoplasma in die Vakuole demonstriert (Li *et al.*, 1996) wurde. In der Pflanze wurde *AtMRP3* transkriptional durch erhöhte Cd-Konzentrationen hochreguliert, was mit verstärkter Cd-Akkumulation in Pflanzenorganen einherging (Bovet *et al.*, 2003). Allerdings konnte für keinen anderen der vier charakterisierten *AtMRPs* (1, 2, 4 und 5) eine Rolle bei der Metalldetoxifikation nachgewiesen werden (Rea *et al.*, 2003). Erst kürzlich wurde vorgeschlagen, dass *AtPDR12* eine Rolle bei der Pb-Toleranz von *Arabidopsis* spielt (Lee *et al.*, 2005). *AtAMT1* exportiert mutmaßlich *Fe/S-Cluster* aus Mitochondrien (Kispal *et al.*, 1999).

1.2.2 Metall-Aufnahmesysteme

***Natural resistance associated macrophage protein* (NRAMP)-Familie** NRAMPs sind eine hochkonservierte ubiquitäre Familie von Metalltransportern, die sich durch 12 Transmembranhelices (TMs) und ein charakteristisches »Konsensus-Transport-Motiv« zwischen TM-8 und TM-9 auszeichnen. Für Mitglieder dieser Familie wurde Transport von verschiedenen zweiwertigen Metallkationen inkl. Cu, Fe, Mn und Zn gezeigt (Übersicht in Williams *et al.*, 2000). Als Transportmechanismen wurden bei verschiedenen Mitgliedern der H^+/Me^{2+} -Symport oder auch der H^+/Me^{2+} -Antiport nachgewiesen (Goswami *et al.*, 2001; Mackenzie und Hediger, 2004). In *Arabidopsis* wurden sechs Mitglieder dieser Familie identifiziert (NRAMP1–6; Mäser *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2000), sowie EIN2, einem an der Ethylen-Signalkette beteiligtem Protein (Übersicht in Guo und Ecker, 2004; Benavente und Alonso, 2006), dessen N-terminalen Domäne Homologie zu den anderen NRAMP-Proteinen zeigt (Alonso *et al.*, 1999). Für *AtNRAMP3* und -4 wurde gezeigt, dass sie essentiell für die Mobilisierung von vakuolären Fe-Speichern bei der Samenkeimung sind (Lanquar *et al.*, 2005). Auch für *AtNRAMP1* wurde Fe-Transport durch Komplementation einer Hefe-Fe-Aufnahmemutante gezeigt.

Bei Überexpression in Pflanzen zeigten diese verstärkte Toleranz gegenüber toxischen Fe-Konzentrationen.

Zinc-regulated transporter, Iron-regulated transporter-like Protein (ZIP)-Familie Mit über 100 identifizierten Mitgliedern in allen drei Reichen des Lebens stellen die ZIPs eine sehr große Familie Kationen-transportierender Membranproteine dar (Grotz *et al.*, 1998; Guerinot, 2000). Allein in *Arabidopsis* wurden neben dem zuerst identifizierten Mitglied der Familie, IRT1, 14 weitere ZIPs identifiziert. Die meisten ZIPs verfügen über acht Transmembranhelices, mit den C- und N-Termini außerhalb des Zytoplasmas und über eine His-reiche Region variabler Länge und Sequenz zwischen TM-3 und TM-4. Ähnlich wie bei den CDF – die eine ähnliche His-reiche Region enthalten (s. unten) – wird vermutet, dass dieser putativ Metall-bindende Bereich am Transportmechanismus oder an dessen Regulation beteiligt sein könnte, oder möglicherweise eine Determinante der Metallspezifität ist (Mäser *et al.*, 2001). Die ZIPs lassen sich in vier Untergruppen einteilen, wobei fast alle *Arabidopsis*-ZIPs in eine Gruppe fallen (Mäser *et al.*, 2001; Hanikenne *et al.*, 2005). Für *AtIRT1*, den mutmaßlich wichtigsten Fe-Aufnahme-Transporter der Wurzel (Vert *et al.*, 2002), wurde gezeigt, dass er Fe, Cd, Mn, Zn und Co transportieren kann (Korshunova *et al.*, 1999). Eine regulatorische Wirkung auf die Expression in epidermalen Wurzelzellen wurde aber nur für Cd, Zn und Fe festgestellt. Erhöhte Transkriptmengen traten nur bei Fe-Defizienz auf. Es akkumulierte kein Protein in der Zellmembran der Wurzelzellen, wenn Zn oder Cd im Wachstumsmedium waren: Cd reguliert direkt die Transkriptmenge, wohingegen Zn die Akkumulation des Proteins posttranskriptional inhibiert. Auch Fe reguliert die IRT1-Proteinmenge posttranskriptional, was aus fehlender Proteinakkumulation in Fe-suffizienten Wurzeln einer *p35S::IRT1*-Linie geschlossen wurde (Connolly *et al.*, 2002). Als Substrat dient *AtIRT1* die zweiwertige Form Fe^{2+} , weshalb die Fe-Aufnahme kritisch von der Aktivität der Fe^{3+} -Reduktase *AtFRO2* (*ferric chelate reductase*) abhängt, welche ebenfalls in der Plasmamembran epidermaler Wurzelzellen lokalisiert ist (Übersicht über die FRO-Familie in Wu *et al.*, 2005). *AtIRT2*, obwohl wie IRT1 ein Fe-Transporter, scheint den Ausfall von IRT1 nicht kompensieren zu können (Henriques *et al.*, 2002). Von anderen Mitgliedern der ZIP-Familie wird angenommen, dass sie wichtige Aufnahmesysteme der Wurzel für Zn sind bzw. an der Verteilung von Zn in der Pflanze beteiligt sind, wie z. B. ZIP1, -2 und -3, -4 und -6 (Grotz *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2004; Becher *et al.*, 2004)

Copper transport (COPT)-Familie Hierbei handelt es sich um eine eukaryotische Familie von Membranproteinen, bei denen aufgrund der nur drei Membranhelices der N-Terminus (extrazellulär) und der C-terminus (intrazellulär) auf unterschiedlichen Seiten der Membran lokalisiert sind (Eide, 1998). In Hefe muss Cu^{2+} vor dem Transport zu Cu^+ reduziert werden, was durch dieselbe Reduktase vermittelt wird, die auch an der Fe-Aufnahme beteiligt ist (Fre1p). In *Arabidopsis* wurden fünf Mitglieder identifiziert (COPT1 bis COPT5, Sancenon *et al.*, 2003), die mit Ausnahme von COPT4 die

Cu-Aufnahme einer hierin defekten Hefemutante wiederherstellen. Näher charakterisiert wurde nur COPT1. Eine *AtCOPT1-Knockdown*-Mutante von *Arabidopsis* zeigte reduzierte Cu-Aufnahme, verstärktes Wurzellängenwachstum und Defekte in der Pollenentwicklung (Sancenon *et al.*, 2004).

Yellow Stripe Like (YSL)-Familie Mitglieder der YSL-Familie wurden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit *ZmYS1* identifiziert, einem Protein, das als H⁺/Fe-Phytosiderophor-(PS)-Symporter identifiziert wurde (Curie *et al.*, 2001; Schaaf *et al.*, 2004). Die Hauptfunktion von YS1 in Mais ist die Aufnahme dieser Komplexe aus dem Boden, obwohl YS1 auch in Blättern von Fe-defizienten Pflanzen akkumuliert. Dies deutet auf eine zusätzliche Rolle bei der Metallverteilung in der Pflanze hin. Da Fe von Nicht-Gräsern durch eine andere Strategie aufgenommen wird (s. ZIP-Familie), ist eine Hauptfunktion als Fe-Aufnahmesystem bei *Arabidopsis*-Homologen unwahrscheinlich. *Arabidopsis* verfügt über acht YSL-Proteine. Aufgrund der Unfähigkeit der Nicht-Gräser PS zu synthetisieren, wird angenommen, dass hier stattdessen Metall-Nicotinamin (NA)-Komplexe als Substrat dienen. Die bekannten Daten über *AtYSL1* und -2 deuten daraufhin, dass diesen Transportern mutmaßlich eine Rolle bei der Metallverteilung in der Pflanze zukommt (DiDonato *et al.*, 2004; Schaaf *et al.*, 2005).

1.2.3 Metall-Exportsysteme

P_{1B}-ATPase Familie Mitglieder der Superfamilie der P-Typ-ATPasen (Axelsen und Palmgren, 2001) nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um Kationen über die Membranbarriere zu transportieren. Der Name deutet auf die bei jedem Transportzyklus auftretende charakteristische Phosphorylierung eines konservierten Aspartatrestes hin. Die Superfamilie wurde in verschiedene Unterfamilien geteilt, wobei sich Transporter der Übergangsmetalle in der Familie der P_{1B}-ATPasen gruppieren (Williams und Mills, 2005). In *Arabidopsis* wurden acht Mitglieder dieser Familie identifiziert (*Heavy metal P-Typ ATPase* (HMA)1 bis HMA8) und z. T. charakterisiert. Charakteristisch sind acht Transmembranhelices, wobei sich in der sechsten ein konserviertes Cys-Pro-Cys/His /Ser (CPx)-Motiv befindet. Von diesem wird angenommen, dass es eine Rolle beim Transportmechanismus spielt. HMA2 und HMA4 sind in der Zellmembran lokalisiert, wobei ihnen eine mögliche Funktion bei der Beladung des Xylems mit Zn zugeschrieben wird (Hussain *et al.*, 2004; Eren und Arguello, 2004; Mills *et al.*, 2003; Verret *et al.*, 2004, 2005; Mills *et al.*, 2005). Für HMA3 wurde gezeigt, dass es Cd und Pb aus dem Zytoplasma exportiert (Gravot *et al.*, 2004). HMA1, -6, -7 und -8 sind Cu-transportierende ATPasen. Hierbei sind HMA1 und HMA6 (PAA1) involviert in der Versorgung des Chloroplasten mit Cu und HMA8 (PAA2) transportiert Cu weiter in die Thylakoide (Shikanai *et al.*, 2003; Abdel-Ghany *et al.*, 2005b; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Für HMA7 (RAN1) wurde gezeigt, dass es wichtig für den Cu-Transport in Post-Golgi-Vesikeln ist, in welchen Cu in einen Ethylen-Rezeptor als Metall-Kofaktor integriert wird (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste und Kieber, 2000). Für das letzte Mitglied der *A. thaliana*-P_{1B}-

Familie, HMA5, wurde vorgeschlagen, dass es an der Detoxifizierung von Cu in Wurzeln unter Cu-Überschuss beteiligt ist (Andres-Colas *et al.*, 2006). Es wurden diverse zum Hefe-Atx1 homologe Cu-Chaperone identifiziert und deren Interaktion mit HMAs und anderen Proteinen z. T. nachgewiesen (Wintz und Vulpe, 2002; Arnesano *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2005; Andres-Colas *et al.*, 2006).

Calcium Exchanger (CAX)-Familie Über die CAX-Familie ist bisher wenig bekannt. Aufgrund der mit *AtCAX1*, -2, -3 und -4 gewonnenen Daten nimmt man an, dass es sich bei den CAX um H^+/Me^{2+} -Antiporter handelt (Me–Metall). In *Arabidopsis* wurden elf Mitgliedern der CAX-Familie identifiziert, für die 10 bis 14 Transmembranhelices vorhergesagt wurden. Für *CAX1* und -3 wurde eine synergistische Funktion in *Arabidopsis* vorgeschlagen (Cheng *et al.*, 2005): Beide wurden in der vakuolären Membran lokalisiert, wobei *CAX1*-Transkript hauptsächlich in Blättern und *CAX3*-Transkript hauptsächlich in Wurzel detektiert wurde. Die Doppelmutante zeigte eine fast 50%ige Reduktion der vakuolären H^+ -ATPase-Aktivität und stark beeinträchtigtes Wachstum mit nekrotischen Blattspitzen und Blüten. Für *OsCAX1* wurde vorgeschlagen, dass es eine Rolle bei der Kälteakklimatisation und der Morphogenese der Pflanze spielt (Kamiya *et al.*, 2006). Auch für *CAX2* und -4 wurde vakuoläre Lokalisation sowie Mn/Ca-Transport (Hirschi *et al.*, 2000) bzw. nur Ca-Transport gezeigt (Schaaf *et al.*, 2002), wobei *CAX4* bei heterologer Expression in Hefe erst nach der Modifikation der N-terminalen Domäne Ca-Transportaktivität zeigte (Cheng *et al.*, 2002). Tatsächlich wurden *CAX-interacting proteins* (*CXIP1* und -2) identifiziert, die *in vivo* durch Interaktion mit der N-terminalen Domäne von *CAX4* dessen Aktivität modulieren (Cheng und Hirschi, 2003). Für *AtMHX1*, einem zusätzlichen Mitglied dieser Familie wurde nachgewiesen, dass es ein $(Mg^{2+}/Zn^{2+})/H^+$ -Antiporter der vakuolären Membran ist (Shaul *et al.*, 1999). Die Autoren schlugen vor, dass *MHX1* im Aufbau eines vakuolären Zn- und Mg-Pools in den Parenchymzellen des Xylems involviert ist, der zu Zeiten der Defizienz mobilisiert werden kann oder als Puffer für die Beladung des Xylems mit diesen Ionen dient.

Cation Diffusion Facilitator (CDF)-Familie Alle identifizierten Mitglieder der ubiquitären CDF-Familie verfügen charakteristischerweise über eine *Cation-efflux*-Domäne (CE, PFAM 01545) und sechs Transmembranhelices (TM), wobei vorhergesagt wird, dass der N- und C-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite liegen (Mäser *et al.*, 2001; Paulsen und Saier, 1997). Ebenfalls auf dieser Seite befindet sich bei eukaryotischen Mitgliedern eine His-reiche Region stark variierender Länge zwischen TM-4 und TM-5, von der angenommen wird, dass sie an der Metallbindung beteiligt ist (Huang und Gitschier, 1997; Williams *et al.*, 2000) und evtl. eine Rolle bei der Metallspezifität der CDF-Proteine spielt (Persans *et al.*, 2001). Zwischen den teilweise hochhomologen Transmembrandomänen zeigen die Mitglieder der CDF-Familie eine ungewöhnliche Variabilität (Paulsen und Saier, 1997). Für *CzcD*, einem CDF-Protein aus *Bacillus subtilis*, wurde nachgewiesen, dass es ein $Me^{2+}/(K^+/H^+)$ -Antiporter ist (Guffanti *et al.*, 2002). Für *ZitB*, einem CDF-Mitglied aus *Escherichia coli* (*E. coli*), konnte

nur ($\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$)/ H^+ -Antiport nachgewiesen werden – ein K^+ -Gradient vermittelte keine Cd^{2+} oder Zn^{2+} -Transportaktivität (Chao und Fu, 2004). Auch für ein eukaryotisches CDF-Protein, *ScZrc1*, wurde $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiport-Aktivität vorgeschlagen (MacDiarmid *et al.*, 2002). Anhand dieser Beobachtungen kann man mutmaßen, dass pflanzliche CDFs, wie die Mitglieder der CAX-Familie, $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter sind. Der Nachweis der Existenz von Dimeren für *PtdMTP1* – einem CDF-Protein aus Pappel – deutet darauf hin, dass der aktive Transportkomplex ein Homo- oder Heteromer von CDF-Proteinen sein könnte (Blaudez *et al.*, 2003).

In *A. thaliana* wurden zwölf Mitglieder der CDF Familie identifiziert, MTP1 bis MTP12 (MTP–*Metal Tolerance Protein* gemäß Mäser *et al.*, 2001, phylogenetischer Baum einiger Mitglieder in **Abbildung 1.1**), deren Funktion und Metallspezifität zum Großteil noch zu untersuchen sind. ZAT1

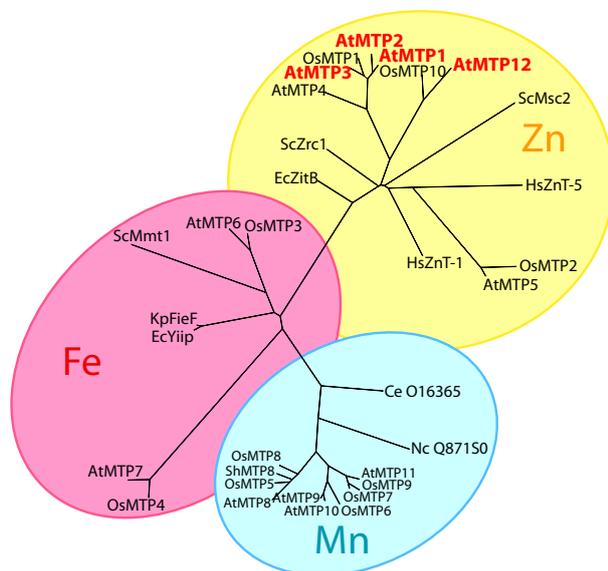


Abb. 1.1: Phylogenetischer Baum der CDF Familie. Mit freundlicher Genehmigung von Hanikenne *et al.* (2005) übernommen (modifiziert). Der Baum wurde auf Basis der Metallspezifität einiger charakterisierter Mitglieder farblich unterteilt.

(*AtMTP1*) war der erste identifizierte CDF-Transporter in *Arabidopsis* (van der Zaal *et al.*, 1999) und ist inzwischen gut charakterisiert (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Kobae *et al.*, 2004; Krämer, 2005). Demnach wird ihm die Rolle des Transports von überschüssigem zytoplasmatischen Zn in die Vakuole, und damit die Vermittlung einer basalen Zn-Toleranz zugeschrieben. Promotoraktivität wurde in Blütenknospen, in Staubfäden und -beuteln reifer Blüten, in jungen Blättern und im Meristem sowie der Elongationszone von Wurzeln detektiert – also vorwiegend in jungen wachsenden Geweben – und war unabhängig von der Zn-Konzentration im Wachstumsmedium. Daraus wurde geschlossen, dass MTP1 für den Aufbau eines Vorrats an Zn in jungen Zellen durch Speicherung in der Vakuole sorgt, wodurch gleichzeitig ein Schutz vor überschüssigem Zn-Angebot gewährleistet wird. Je nach Stabilität des Proteins könnte *AtMTP1* jedoch auch eine Rolle in ausgewachsenen Geweben spielen. Erst kürzlich wurde die Charakterisierung von *AtMTP3* publiziert (Arrivault *et al.*, 2006). Wie *AtMTP1* ist *AtMTP3* in der vakuolären Membran lokalisiert und transportiert Zn in die Vakuole; im Vergleich

zu MTP1 aber auch in ausgeprägterem Maße Co. Die Transkription von *AtMTP3* wird im Gegensatz zu *AtMTP1* in Abhängigkeit von exogen zur Verfügung gestelltem Zn hochreguliert. Wie für *AtMTP1*, wird ohne Metallstress Promotoraktivität in Staubfäden und -beutel festgestellt, wobei allerdings die in Blüten festgestellten Transkriptmengen unter diesen Bedingungen niedrig sind. Dies deutet auf funktionelle Redundanz in diesen Geweben hin, die allerdings in jungen Blättern und in Wurzeln nicht gefunden wird. Im Gegensatz zu MTP1 wird für MTP3 in jungen Blättern gar keine Promotoraktivität festgestellt und in Wurzeln in anderen Zonen: Unter Zn-Stressbedingungen wird starke *pMTP3*-Promotoraktivität in Kortex- und Epidermiszellen der Spezialisierungs-/Wurzelhaarzone festgestellt. Diese Zonen liegen oberhalb des Bereichs, in dem *pMTP1*-Promotoraktivität gefunden wird (Wurzelkappe, Meristem, Elongationszone). Niedrige konstitutive *pMTP3*-Promotoraktivität wurde auch in der Phloemregion im Spross, Blättern und Blattansätzen detektiert. Es wurde festgestellt, dass *MTP3* und *IRT1* transkriptional co-reguliert sind. Wie oben erwähnt, ist das Fe-Aufnahmesystem IRT1 relativ unspezifisch bezüglich der transportierten Metalle, wodurch nach Hochregulation dieses Transporters unter Fe-Mangel potentiell zuviel Zn, Co und/oder andere Metalle aufgenommen werden. Es wurde beobachtet, dass unter Fe-Mangel Zn in der Wurzel durch *AtMTP3* immobilisiert wird. Eine mögliche Erklärung könnte in dem Umstand liegen, dass Zn-Übersorgung unter Fe-Mangel besonders kritisch ist aufgrund der kompetitiven Substitution von Fe²⁺ in Fe-haltigen Proteinen durch Zn²⁺ (Woolhouse, 1983). Demnach schützt *AtMTP3* die Pflanze vor Zn-Toxizität bei Übersorgung mit Zn durch Transport und Immobilisierung von überschüssigem Zn in Vakuolen von epidermalen- und Kortexzellen der Wurzelhaarzone. Nur ein weiteres Mitglied der CDF-Familie, *AtMTPII*, wurde teilweise funktionell charakterisiert (Dale Sanders, nicht publiziert). Die bisher erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass *AtMTPII* durch Transport von überschüssigem Mn in das Golgi-System Toleranz gegenüber erhöhten Mn-Konzentrationen verleiht.

Im Vergleich zu anderen Organismen sind die Familien der Metalltransporter in Pflanzen vergleichsweise groß (Hall und Williams, 2003). Hierfür gibt es eine Reihe von möglichen Gründen: Als sesshafte Organismen müssen Pflanzen ihre Metallversorgung unter Bedingungen extrem variierender bioverfügbarer Metallkonzentrationen gewährleisten. Unter Umständen gibt es für häufig auftretende (Mangel-/Überschuss-) Verhältnisse zwischen den Metallen (Zn:Fe:Mn:Mg...) jeweils eigene »Sätze« von Transportern. Mit einem solchen System könnte durch wenige Transporter eine Grundversorgung der Pflanze gewährleistet werden. Sollte durch Aufnahmesysteme mit breitem Substratspektrum ein Ion in unerwünscht hohem Maße aufgenommen werden, könnte durch spezifische Transporter eine Feinregulation erfolgen: entweder wird das Ion wieder aus der Zelle exportiert oder in der Vakuole detoxifiziert. Ein Hinweis, der eine solche Annahme stützt, ist das breite Substratspektrum von IRT1. IRT1 transportiert neben dem Hauptsubstrat Fe unter anderem Mn und Zn (s. oben). Bei alkalischem pH sinkt nicht nur die Löslichkeit von Fe, sondern auch von Mn und Zn. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass gewisse Mangelbedingungen in der Natur häufig mit anderen einhergehen, wobei die

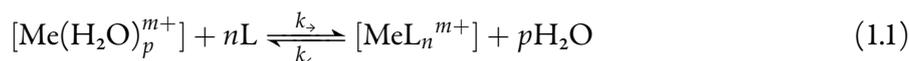
Metallhomöostase unter diesen Bedingungen durch wenige Transportern mit breitem Substratspektrum gewährleistet wird. Für den Fall, dass dies nicht so ist, könnte möglicherweise die Expression eine Reihe spezifischer Transporter notwendig sein. Die Diversität innerhalb der Metalltransporterfamilien mag auch für die Reaktion auf verschiedene Stressbedingungen notwendig sein, sowie um die Anforderungen des Metalltransports in den verschiedenen Organell- und zellulären Membranen innerhalb der Pflanze zu erfüllen. Mutmaßlich brauchen Pflanzen für die Anpassung an extreme Bedingungen infolge von Umwelteinflüssen eine Reihe hoch- und niedrigaffiner Systeme. Die bisher bekannten Informationen über die CDF-Familie sprechen gegen eine funktionelle Redundanz der einzelnen Mitglieder und deuten vielmehr darauf hin, dass alle Mitglieder eine besondere Funktion in der Pflanze übernehmen.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, mit *AtMTP2* und *AtMTP12* zwei weitere Mitglieder der CDF-Familie zu charakterisieren.

1.3 Screen zur Identifikation von Interaktoren für Mitglieder der *Cation Diffusion Facilitator* Familie

Es gibt Beobachtungen und Überlegungen, mit denen man eine Hypothese stützen kann, dass Metallionen zumindest einige der beschriebenen Transporter innerhalb der Zelle nicht durch Diffusion erreichen oder verlassen, sondern möglicherweise in Vesikeln transportiert werden oder spezifisch an Metallochaperone gebunden sind, die als *Shuttle* dienen. So wurde für einige Metalle experimentell nachgewiesen, dass statistisch nur ein ungebundenes Ion pro einer Million Zellen vorhanden ist und somit die intrazelluläre Konzentration an freiem Metall praktisch Null ist (Cu in Hefe s. Rae *et al.*, 1999; Zn in *E. coli* s. Outten und O'Halloran, 2001). Da Metalle wie Cu, Fe, oder Mn in Proteinen häufig als Redox-Katalysatoren dienen, ist diese Beobachtung im evolutionären Kontext insofern sinnvoll, als dass jedes dieser Ionen in freier Form einen Ort unkontrollierbarer Redox-Reaktionen darstellen kann. Da diese für die Zelle potentiell schädlich sind, kann man von einem evolutionären Druck ausgehen, diese Metallionen kontrolliert durch spezifische intrazelluläre *Trafficker* (Metallochaperone) zu binden und zu transportieren. Tatsächlich wurden in Hefe und im Menschen Chaperone für Cu gefunden (Valentine und Gralla, 1997). Für Cu und Zn wurde geschätzt, dass die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen in der Zelle in Proteinen und Chelatoren den Gesamt-Metallionengehalt bereits übersteigen. Zusätzlicher Bindung von Metallen an spezifische und unspezifische Bindungsstellen wie Aminosäuren und Membranen deutet auf eine Überkapazität an Bindungsstellen für Cu und Zn hin, was mutmaßlich auch für andere essentielle Übergangsmetalle gilt (Rae *et al.*, 1999; Outten und O'Halloran, 2001). Dies lässt eine rein diffusionsgesteuerte Kontrolle der zellulären anorganischen Chemie vieler Metalle unwahrscheinlich erscheinen. Vielmehr sprechen thermodynamische und kinetische Überlegungen für eine gezielte Be- und Entladung von Metall-benötigenden Proteinen (Metalloproteinen) und Me-

talltransportproteinen durch Metallochaperone oder durch Interaktion mit Metallchelator-Komplexen: In einer wässrigen Umgebung wird die Beständigkeit bzw. thermodynamische Stabilität eines hydratisierten Komplexes MeL_n ausgedrückt durch die Komplexbildungskonstante K_B der Substitution von Wassermolekülen hydratisierter Metallionen $[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_p]^{m+}$ durch hydratisierte Liganden L. Die Umkehrung $1/K_B$ wird als Komplexdissoziationskonstante K_D bezeichnet. Es gilt:



$$K_D = \frac{1}{K_B} = \frac{k_{\leftarrow}}{k_{\rightarrow}} = \frac{[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_p]^{m+} \cdot [\text{L}]^n}{[\text{MeL}_n]^{m+}}. \quad (1.2)$$

Die Komplexbildungskonstante K_B hängt gemäß (1.3 a) mit der freien Enthalpie ΔG_B der Komplexbildungsreaktion zusammen, für die wiederum die Gibbs-Helmholtz-Gleichung (1.3 b) gilt:

$$(a) \Delta G_B = -2,303 \cdot RT \log K_B; \quad (b) \Delta G_B = \Delta H_B - T\Delta S_B, \quad (1.3)$$

Hieran ist ersichtlich, dass neben der Reaktionsenthalpie ΔH_B auch die Entropieänderung ΔS_B einer Reaktion Einfluss auf K_B hat: Bei der Substitution der H_2O -Liganden durch mehrzählige Liganden wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), den meisten Metall-Pufferverbindungen (Nicotianamin, Phytosiderophore, Metallothioneine) oder auch Metalloproteinen, führt die auf die Freisetzung von Wasser zurückzuführende Entropiezunahme (»Chelat-Effekt«) zu einer erhöhten thermodynamischen Stabilität (einem negativeren ΔG_B), was sich in einem niedrigen K_D -Wert widerspiegelt. Die Dissoziationskonstanten von Metalloproteinen unterscheiden sich in ihrem Wert nicht maßgeblich von denen unspezifischer Bindungsstellen und sind zum Teil sogar größer als die Dissoziationskonstanten von Metall-Puffersubstanzen wie Nicotianamin (Stephan und Scholz, 1993). So sind z. B. für Zn die Dissoziationskonstanten der meisten untersuchten Enzyme bei neutralem pH-Wert ($K_D \approx 10^{-7} - 10^{-10}$) tausend- bis millionenfach (z. B. Alkalische Phosphatase) größer als die von Metallothionein ($K_D = 3,2 \cdot 10^{-13}$) (Jacob *et al.*, 1998). Die Aufnahme von Zn durch die Apo-Formen der Metalloproteine aus dem wässrigen Pool ist für solche Proteine in der Gegenwart des höher Zn-affinen Apo-Metallothionein thermodynamisch stark benachteiligt – insofern die Metallbeladung des Proteins und von Metallothionein im selben Kompartiment stattfindet.⁹ Selbst wenn die Apo-Metalloproteine eine mit Puffersubstanzen vergleichbare Affinität gegenüber Zn haben, sprechen kinetische Gründe gegen die Beladung von Apo-Metalloproteinen (z. B. neusynthetisierten) aus dem wässrigen Pool: Der niedrige Wert der Dissoziationskonstanten K_D der Metallbindung an unspezifischen Bindungsstellen und Puffersubstanzen ist ein Hinweis auf eine niedrige Dissoziationsrate k_{\leftarrow} der Metalle von diesen Bindungsstellen, da $K_D = k_{\leftarrow}/k_{\rightarrow}$. Dies ist ein Ausdruck der Tatsache, dass thermodynamisch stabile Verbindungen

⁹Die Kompartimentierung der Metallbeladung von Metallothionein ist nicht bekannt.

dungen auch kinetisch stabil sind: Für den Übergang des energieärmeren (stabileren) Metall/Ligand-Komplexes der Puffersubstanz zum energetisch höheren Metall/Wasser-Komplex (Rückreaktion der **Gleichung [1.1]**) muss zusätzlich zur freien Aktivierungsenthalpie der Hinreaktion $\Delta G_{\ddagger}^{\rightarrow}$ die freie Reaktionsenthalpie ΔG_{\rightarrow} der Hinreaktion aufgebracht werden, also $\Delta G_{\ddagger}^{\leftarrow} = \Delta G_{\rightarrow} + \Delta G_{\ddagger}^{\rightarrow}$. Einer Gleichgewichtsverteilung der Metalle über den Umweg des wässrigen Pools – also der Metall/Wasser-Komplexe gemäß **Gleichung (1.1)** – auf alle verfügbaren Bindungsstellen stehen niedrige Dissoziationsraten im Wege, da die Gleichgewichtseinstellung sehr lange dauern würde. Dieses kinetische Problem des Metalltransfers von Puffersubstanzen (Metallochaperone, niedermolekulare Komplexe) auf Apo-Metalloproteine über den wässrigen Pool könnte durch spezifisch mit den Proteinen interagierende Metallochaperone umgangen werden. Hierfür ist die Dissoziationskonstante unter der Bedingung einer Metallochaperon-Protein-Interaktion maßgeblich, also ohne Umweg über einen Metall/Wasser-Komplex. Die Übertragung des Metalls auf das Ziel-Protein könnte dabei erfolgen, indem durch Konformationsänderung des Metallochaperons bei der Interaktion mit dem Ziel-Protein die Dissoziationsrate des Metallochaperon/Metall-Komplexes steigt (Finney und O’Halloran, 2003). Es besteht also prinzipiell die Möglichkeit, dass Metallochaperonproteine mit Metalltransportern interagieren. Tatsächlich wird für *CeCDF1* und für den hierzu homologen *HsZnT1*, zwei Metalltransporter der CDF-Familie von *C. elegans* und *H. sapiens*, angenommen, dass diese Zn direkt von Raf1 erhalten könnten, wodurch letzteres aktiviert wird (Jirakulaporn und Muslin, 2004). Die ungewöhnliche Koordinations-Umgebung der Zn(II)-Bindung an ZntA, einem P-Typ-ATPase-Transporter aus *S. cerevisiae*, könnte ein Hinweis auf die Existenz von Zn-Chaperonen sein: Statt einer tetrahedralen Koordination von Zn durch vier Protein-Liganden, ist hier Zn nur durch drei Liganden (O bzw. S von zwei Cys und einem Asp) koordiniert, wobei die vierte Position lösungsexponiert ist (Banci *et al.*, 2002). Gegen die Möglichkeit, dass diese Position von einem H₂O Molekül eingenommen wird, sprechen die obigen kinetischen Überlegungen. Daher könnte die vierte Position bei der Zn-Übergabe an den Transporter von einem Chaperon-Ligand besetzt sein. Für diese Theorie spricht die große Ähnlichkeit der Zn(II)-Bindungsstelle von ZntA zu der Cu(I) Bindungsstelle von Ccc2a (Banci *et al.*, 2002), einer Cu-transportierenden ATPase aus *S. cerevisiae*, von der die Interaktion mit dem Cu-Chaperon Atx1 bekannt ist (Arnesano *et al.*, 2001): Mit Ausnahme zweier Liganden ist das Aminosäure-Rückrad der metallbindenden Domäne zwischen beiden Proteinen identisch und eine Cu-Koordinationsstelle ist in Ccc2a lösungsexponiert.

Es gibt Hinweise auf eine Möglichkeit, dass einige Proteine der CDF-Familie aus *Arabidopsis* an das Zytoskelett gebunden sind. Durch Sequenzvergleiche wurden in *AtMTP 1, 3 und 5* histidinreiche Bereiche gefunden, die Homologie zu Hisactophilin aufweisen, für welches eine Bindung an Aktin nachgewiesen wurde (Stoeckelhuber *et al.*, 1996). Dabei wird durch das gehäufte Auftreten von Histidin wahrscheinlich eine pH-Abhängigkeit der Bindung vermittelt. Dem Zytoskelett wiederum misst man eine bedeutende Rolle beim zellulären Transport zu, indem Vesikel oder Proteine aktiv an diesem

Netzwerk entlanggleiten. So wurde in *Xenopus*-Oocyten eine Aktin-abhängige Bewegung von Endosomen beobachtet (Taunton, 2001). Man kann sich daher ein Szenario vorstellen, in dem Vesikel entlang dem Zytoskelett Proteine der CDF-Familie erreichen, durch Proteine vermittelt an diese binden und Metallionen aufnehmen oder abgeben. So wurde für den Fe-Transport in Erythrocyten ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem Fe in Endosomen zu den Mitochondrien geliefert wird (Ponka *et al.*, 2002). Dabei wurde beobachtet, dass durch die Inhibierung der Phosphorylierung von Myosin, einem Protein, das in der Lage ist unter ATP-Verbrauch an Aktinfilamenten entlang zu gleiten, auch die Fe-Inkorporation in Mitochondrien stark reduziert wurde. In beiden Fällen, dem intrazellulären Transport von Metallen durch Metallochaperone oder in Vesikeln, wird ein Kontakt von CDF-Proteinen mit anderen Proteinen erwartet. Es gibt auch weitere mögliche Interaktoren von CDF Proteinen, z. B. Proteine die CDFs regulieren oder von CDFs reguliert werden – wie beispielsweise für das oben genannte Raf1 im tierischen System gezeigt wurde (Jirakulaporn und Muslin, 2004). *AtMTP12* ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da es eventuell eine »konservierte« Interaktion eines unbekannt Proteins mit einem Protein der CDF-Familie darstellt (**Abschnitt 4.1**). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass auch die *Arabidopsis*-CDFs mit sich selbst interagieren, indem sie Homodimere bilden – wie für *PtdMTP1* biochemisch nachgewiesen wurde (Blaudez *et al.*, 2003). Für das bakteriellen CDF Protein YiiP wurde die Funktion als Homodimer inzwischen nachgewiesen (Wei und Fu, 2006). Auch Heteromere oder höhere quaternäre Strukturen sind vorstellbar. Für letztere gibt es keine Hinweise, aber heteromere CDF-Komplexe wurden bereits in Hefe (*Msc2/Zrg17*) und im tierischen System (*ZnT5/ZnT6*) identifiziert (Ellis *et al.*, 2005).

Eine häufig angewandte Methode, um Proteininteraktionen nachzuweisen, bzw. um durch das Screening einer cDNA-Bibliothek Interaktoren (*Preys*) von Proteinen (*Baits*)¹⁰ zu finden, ist das Y2H-System (Causier und Davies, 2002). Allerdings ist diese Methode auf Proteine oder Proteinfragmente beschränkt, die Zugang zum Zellkern haben. Mit dem *Split Ubiquitin System* (SUS) wurde durch Johnson und Varshavsky (1994) eine Methode entwickelt, mit der auch Interaktionen von Membranproteinen als Ganzes nachgewiesen werden können. Dabei wird das *Bait*-Protein mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin sowie einem Reporterprotein fusioniert und in Hefezellen exprimiert, die zudem *Prey*-Proteine exprimieren, welche wiederum mit der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin fusioniert sind (**Abbildung 1.2**). Interagieren *Bait* und *Prey*, wird Ubiquitin rekonstituiert und das Reporterprotein durch Ubiquitin-spezifische Proteasen abgespalten.

Das zweite Ziel der Promotionsarbeit ist die Suche nach Interaktoren für Mitglieder der CDF-Familie mit Hilfe des SUS sowie durch biochemische Methoden. Denkbare Ansätze für letzteres sind dabei Untersuchungen zur Existenz von höhermolekularen Proteinkomplexen mittels Gelfiltration oder Co-Immunopräzipitation. Putative Interaktionen sollen dann *in planta* in *A. thaliana* mittels *Fluorescence*

¹⁰Statt »Köder« und »Beute« werden in dieser Arbeit immer die bei *Yeast two Hybrid* (Y2H)-Systemen etablierten Begriff *Bait* und *Prey* verwendet.

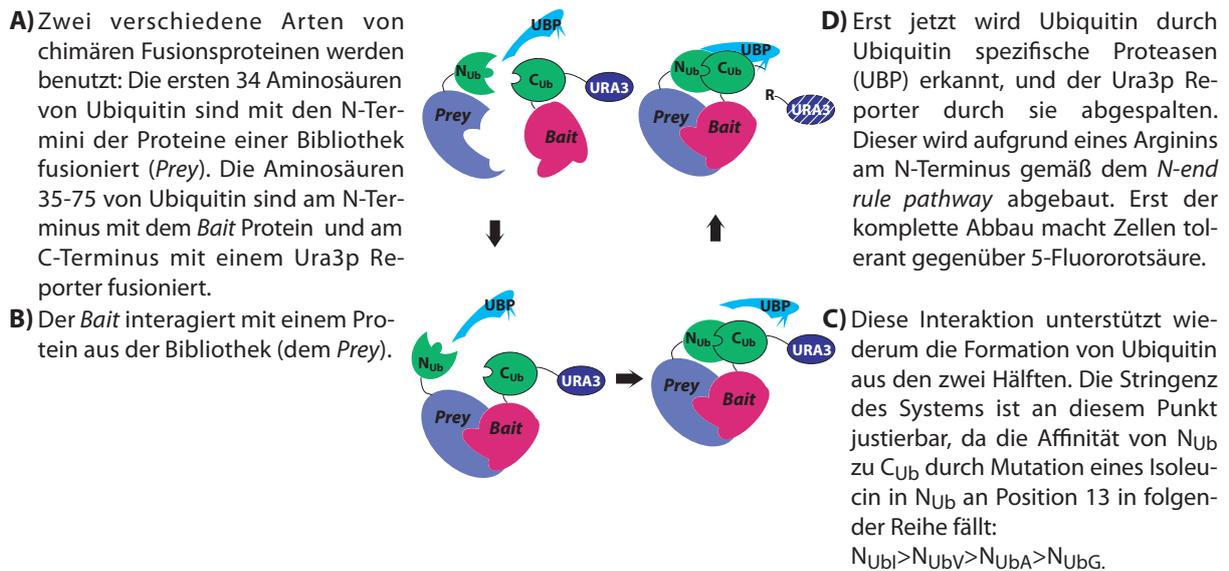


Abb. 1.2: Das *Split Ubiquitin System* (SUS). Für den Screen wird der Hefestamm JD53 eingesetzt.

Resonance Energy Transfer (FRET) (Gadella *et al.*, 1999) oder mittels *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) (Walter *et al.*, 2004) bestätigt werden werden.

1.4 Analyse der elementaren Zusammensetzung von Pflanzen im Hochdurchsatz

Zur Analyse der Elementgehalte von Proben wird heutzutage zumeist der Atomspektrometrie der Vorrang gegenüber chemischen und physikochemischen Methoden gegeben. Aufgrund der fortlaufenden Verbesserung der Gerätetechnik ist es heutzutage möglich, nicht nur ein oder einige wenige Elemente, sondern bis über die Hälfte aller Elemente des Periodensystems in einer Messung simultan zu bestimmen. Auch wenn hierbei physikalisch und chemisch bedingte Limitierungen gelten, kann dadurch z. B. die elementare Zusammensetzung einer Pflanze fast vollständig erfasst werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, in größerem Maßstab Vergleiche zwischen verschiedenen Pflanzenarten oder innerhalb von natürlichen oder Mutanten-Populationen durchzuführen. Solch ein Ansatz könnte einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung wichtiger Komponenten des Metallhomöostasenetzwerks in der Pflanze liefern. Limitierend sind hierbei der Arbeitsaufwand und die Zeit, die zur Analyse einer Probe notwendig sind.

In den folgenden Abschnitten wird eine kurze Übersicht über atomspektroskopische Methoden gegeben, sowie das Funktionsprinzip der ICP OES vorgestellt. Eine etablierte Methode zur Probenaufbereitung für die Analyse ist hierbei die Probenverflüssigung durch Säure-Auflösung. Für die Analyse

von Pflanzenproben weniger verbreitet ist das »*solid sampling*« durch elektrothermale Verdampfung (ETV): Hierbei wird die Probe in einer nicht-oxidierenden Atmosphäre stark erhitzt und die elementare Zusammensetzung des entstehenden Aerosols analysiert. In der vorliegenden Arbeit wird die Kopplung eines solchen elektrothermalen Verdampfers mit der ICP OES, sowie die Entwicklung einer Methode für die Analyse von Pflanzenmaterial im Hochdurchsatz beschrieben.

1.4.1 Atomspektrometrie zur Elementanalyse

Bei der Atomspektrometrie wird zwischen Methoden unterschieden, die auf der Absorption von Licht basieren (*Atomic Absorption Spectrometry* (AAS)) und solchen, bei denen die *Lichtemission* nach Anregung von Analyten gemessen wird (*Optical Emission Spectrometry* (OES)). Die AAS basiert auf der Atomisierung des Analyten und der Absorption von charakteristischen Wellenlängen, die elementspezifisch sind. Die spezifische Energie einer Wellenlänge wird absorbiert durch die Energieübertragung auf ein Hüllelektron des Elements, das im angeregten Zustand ein energetisch höheres Orbital besetzt (siehe **Abschnitt 1.4.2** zur näheren Erläuterung). Das Ausmaß der Absorption hängt von der Konzentration des Analyten ab. Als Methoden wären z. B. *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (F AAS), *Solid Sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry* (SS ET AAS) oder *Atomic Absorption Spectrometry with Electrothermal Vaporisation* (ET AAS) zu nennen. Da die Lichtquelle für jedes Element andere charakteristische Wellenlängen zur Verfügung stellen muss, können nur wenige oder gar nur ein Element pro Messung bestimmt werden. Demgegenüber können bei allen Methoden, die auf der Emission von Licht basieren, viele Elemente in einer Messung bestimmt werden – es sind daher Multielement-Methoden. Auch hier werden alle Elemente einer Probe zunächst atomisiert. Im Unterschied zur AAS wird durch eine Hochenergiequelle die Energie für *alle* denkbaren Elektronenübergänge aller Elemente zur Verfügung gestellt (**Abschnitt 1.4.2**) – und nicht nur die Energie eines elementspezifischen Elektronenübergangs. Fallen die angeregten Elektronen auf ihre Ursprungorbitale zurück, kommt es zur Emission von Licht. Jedes Element emittiert Wellenlängen, die nur für dieses Element charakteristisch sind und deren Intensitäten von der Konzentration des Elements abhängen. Als Beispiel für diese Methoden seien die *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (ICP OES), die *Flame Atomic Emission Spectrometry* (F AES) und die *Direct Current Arc Optical Emission Spectrometry* (DCArc-OES) genannt. Der Vorgang der Lichtemission durch das angeregte Elektron findet auch bei der AAS statt. Hierbei wird unter anderem Licht derselben Wellenlänge emittiert, wie zuvor zur Anregung absorbiert wurde. Daher mag man annehmen, dass Absorption und Emission sich gegenseitig aufheben und Licht derselben Intensität detektiert wird, wie eingestrahlt wird. Dies ist nicht der Fall, da diese Emission in alle Raumrichtungen stattfindet und somit die Intensität im Vergleich zur Absorption des Lichts der *gerichteten* Lichtquelle vernachlässigbar ist. Zudem hat nur ein Teil des emittierten Lichts dieselbe Wellenlänge wie die absorbierte.

Die ICP OES ist eine weit verbreitete Technik zur Multielementbestimmung, da bei vertretbaren Kosten schnell und akkurat bis zu 65 Elemente in einer Probe gleichzeitig bestimmt werden können. Für gewöhnlich werden Proben analysiert, indem sie mit Säure aufgeschlossen werden und die gelöste Probe als Nebel in ein als Hochenergiequelle dienendes Argonplasma injiziert (**Abschnitt 1.4.2**). Der Aufschluss ist ein zeit- und arbeitsintensiver Vorgang, weshalb sich diese Art der Überführung von Proben in das Plasma nur mit Einschränkung für den Hochdurchsatz von Proben eignet. Das Screening von *Arabidopsis*-Ökotypen¹¹ oder einer Ethanmethylsulfonat (EMS)-mutagenisierten *A. thaliana*-Population auf Änderungen im Elementgehalt sind denkbare Ansätze zur Identifikation neuer *Quantitative Trait Loci* (QTL) oder neuer Gene, die einen Einfluss auf die Metallhomöostase haben. Hierfür wäre hoher Durchsatz bei der Messung der Elementgehalte eine Grundvoraussetzung. Eine schnelle Methode zur Überführung einer Probe in das Plasma ist die elektrothermale Verdampfung. Eine vortrocknete Probe wird hierfür in mehreren Stufen in einer nicht-oxidierenden Atmosphäre auf bis zu 2500 °C erhitzt und das entstehende Aerosol in das Plasma geleitet. Die Atmosphäre ist *nicht* inert, da halogenierte Kohlenwasserstoffe zur Halogenierung der Probe beigemischt werden. Dies erleichtert die Verdampfbarkeit der Probe und verhindert Ablagerungen bei der Überführung des Aerosols ins Plasma.

1.4.2 Funktionsprinzip der *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

Hüllelektronen von Atomen können grundsätzlich durch Aufnahme diskreter Energien die von ihnen besetzten Orbitale verlassen und energetisch höhere besetzen. Aufgrund der verschiedensten Koppelungsmöglichkeiten mit anderen Elektronen steigt mit zunehmender Ordnungszahl des Elements die Anzahl der Energiezustände, die von diesem Elektron besetzt werden können.¹² Im Fall der Aufnahme sehr großer Energien kommt es zur Ionisierung durch Verlust eines oder sogar zweier Elektronen. Die angeregten Elektronen der Atome oder Ionen können von der Vielzahl der Energieniveaus – z. T. über semistabile Zwischenstufen – ihr ursprüngliches Energieniveau (Orbital) wieder erreichen und senden bei jedem Übergang die Energiedifferenz in Form von Licht entsprechender Energie (Wellenlänge) aus. Selbst für ein simples Element wie Wasserstoff existiert bereits eine sehr große Anzahl besetzbarer Energieniveaus, die zur Emission ebenso vieler verschiedener Wellenlängen führen (Lyman-, Paschen-, Balmer-Serie). Da nicht jeder Energieübergang gleich wahrscheinlich ist, existieren für jedes Element prominente Spektrallinien. Das Spektrum des emittierten Lichts ist somit für jedes Element charakteristisch. Bei der ICP OES wird als Hochenergiequelle meist ein Argonplasma eingesetzt. Die Energie

¹¹*Arabidopsis*-»Ökotyp« wird in dieser Arbeit im Sinne des englischen *Arabidopsis-Accessions* verwendet.

¹²Theoretisch ist die Anzahl für jedes Element unendlich, da zwischen dem letzten angeregten Zustand eines Atoms und dem Verlust eines Elektrons unendlich viele energetische Zwischenzustände existieren. Daher ist jeder *dieser* Zwischenzustände gleich unwahrscheinlich und die darauf zurückgehende Emission (siehe Text) nicht messbar.

zur Elektronenanregung der ins Plasma injizierten Elemente wird Plasmavorgängen entnommen. Sie wird entweder thermisch übertragen durch Energietransfer bei Partikelkollisionen oder durch Absorption von Licht (was als Kollision mit Photonen betrachtet werden kann). Im Argonplasma liegt ein sehr breites Energiespektrum vor, wodurch prinzipiell alle Elemente des Periodensystems gemäß den erörterten Prinzipien anregbar sind. Die Energie des Plasmas wird magnetisch induziert: Das Argon strömt durch eine Quarzröhre, um die einige Windungen einer Spule (*Radio Frequency* (RF)-Generator) gewickelt sind. Bei den meisten Geräten oszilliert der Strom in dieser Spule mit 27 oder 40 MHz, was ein Magnetfeld innerhalb der Quarzröhre erzeugt. Bei der Zündung des Plasmas werden durch die elektrische Entladung eines Kupferdrahtes einige Argonionen erzeugt, die in dem Magnetfeld eingefangen und beschleunigt werden. Durch Kollision mit anderen Argonatomen entsteht Hitze, die zu weiteren Ionisierungen führt. Die Kollisionen und die dadurch bedingte Hitze nehmen daher lawinenartig zu und führen zu einem »brennenden« Plasma. Das Plasma stellt somit eine »hoch energetische Wolke« von gasförmigen Ionen und deren Elektronen dar. Generalisiert kann bei jeder Materie von einem Plasma gesprochen werden, wenn diese mehr als 1 % Elektronen und positive Ionen neben neutralen Atomen und Molekülen enthält. Wie schon erwähnt, wird für die ICP OES gewöhnlich Argon genommen. Die Energie und somit die Hitze des Plasmas kann durch den RF-Generator eingestellt werden, der für gewöhnlich zwischen 750 und 1 500 W induziert.

Wird eine Probe in das Plasma gebracht, durchläuft sie mehrere Zonen: Bei einer flüssigen Probe entstehen zunächst aus dem injizierten Aerosol feste Partikel. Durch die zunehmende Hitze wird die Probe im weiteren Verlauf gasförmig, erreicht dann Zonen wo Moleküle zu Atomen zerfallen und liegt in der analytische Zone des Plasmas bei $\approx 6000\text{--}7000\text{ K}$ in Form von angeregten Atomen und Ionen vor. Diese repräsentieren die elementare Zusammensetzung der Probe. Bei vielen Geräten kann das von den angeregten Atomen oder Ionen emittierte Licht radial zur Quarzröhre – meist durch ein kleines Loch – oder axial detektiert werden: Der Anwender kann für jedes Element entscheiden, ob die radiale oder axiale Emission einer charakteristischen Emissionslinie gemessen werden soll. Schwache Emissionslinien, deren Intensität unempfindlich gegenüber Temperaturunterschieden im beobachteten Plasma ist, werden vorzugsweise axial gemessen, starke radial. Um die große Vielzahl an Emissionslinien spektral zu trennen, wird das Licht zunächst auf ein Brechungsgitter gelenkt. Die erreichbare spektrale Auflösung eines Brechungsgitter liegt Größenordnungen über der eines Prismas und korreliert mit der Anzahl der Rillen pro mm. Zudem entstehen viele Brechungsordnungen, deren Spektren sich mit zunehmender Ordnung überlagern. Dies nutzt man aus, um das emittierte Spektrum zweidimensional auf einem Detektorchip abzubilden: Hierfür »fächert« man die sich überlagernden hohen Brechungsordnungen spektral mittels eines gewöhnlichen Prismas auf. Auf dem Chip wird also z. B. oben links das Infrarotspektrum der 90sten Brechungsordnung abgebildet und unten rechts das UV-Spektrum der 160sten Brechungsordnung (s. a. Abbildung neben **Tabelle 5.1**). Um zu vermeiden, dass die größte Intensität des vom Brechungsgitter gebrochenen Lichts in der ersten Brechungsordnung ist

– wie dies z. B. bei einer handelsüblichen CD zu beobachten wäre – haben die Brechungsgitter eine Sägezahnstruktur, wodurch das Licht auf die hohen Brechungsordnungen gelenkt wird. Trotz dieses Aufwands, mit dem eine spektrale Auflösung im Bereich von 0,01 nm erreicht wird, liegen die Emissionslinien verschiedener Elemente z. T. zu dicht beieinander, um sie zu trennen. Da die Intensität einer Emissionslinie mit der Konzentration eines Elements im Plasma korreliert, kann für jedes Element die Kalibration mit Standardsubstanzen durchgeführt werden, die bekannte Konzentrationen dieses Elements enthalten.

Das dritte Ziel der Promotionsarbeit ist die Verbesserung einer Kopplungsmethode zwischen einem Gerät für die elektrothermale Verdampfung und der ICP OES für die Analyse von Pflanzenproben im Hochdurchsatz.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden, wie die Transformation und Kultur von *E.coli*, Plasmidisolierung, *blunt end*-Erzeugung von DNA-Strängen, Dephosphorylierung von DNA, Präzipitation von DNA oder DNA-Extraktion aus Pflanzen, wurden gemäß Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Die enzymatische Restriktionspaltung von DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt/M., Deutschland) entsprechend den Anleitungen des Herstellers. Vom Herstellers Roche Diagnostics stammte auch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Für Sequenzierung bestimmte Plasmidpräparation aus *E. coli*, sowie für die Aufreinigung von PCRs oder Gelfragmenten wurden die Kits QIAPREP® SPIN MINIPREP bzw. QIAQUICK® GEL EXTRACTION des Herstellers Quiagen verwendet.

2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCRs zu Klonierungszwecken wurden mit dem PFU TURBO®-Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gemäß den Empfehlungen des Hersteller durchgeführt. Für alle anderen Zwecke wurde REDTAQ™-DNA-Polymerase (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) oder Taq-Polymerase (eigene Herstellung) eingesetzt. Die Bindungstemperaturen (T_m) von *Perfect Match* oder *Mismatch*-Primern wurden mit MELTCALC (Schütz und von Ahsen, 1999) gemäß der *Maximum Neighborhood*-Methode berechnet. Im entsprechenden Schritt der PCR wurde eine 5 °C niedrigere Temperatur verwendet,¹ um die quantitative Bindung der Primer an die Matrize zu gewährleisten. Die Länge des Amplifikationsschrittes richtete sich nach der Prozessivität der Polymerase (PFU TURBO® $\approx 500 \text{ bp} \cdot \text{min}^{-1}$, Taq: $\approx 1000 \text{ bp} \cdot \text{min}^{-1}$). Das folgende Grundprogramm wurde verwendet: 2 min bei 94 °C, gefolgt von 25 Zyklen bestehend aus 30 s bei 94 °C, 15 s bei $T_m - 5 \text{ °C}$, 1 min pro 500 bp (1000 bp) zu amplifizierender Matrize bei 68/72 °C (Pfu/Taq) und abschließend 4 min bei 72 °C. Wenn durch überlange Primer Sequenzen einge-

¹Bei sehr langen Primern mit einer $T_m - 5 \text{ °C} > 72 \text{ °C}$ wurde dieselbe Temperatur verwendet wie im Amplifikationsschritt.

führt wurden, ist nach den ersten fünf Zyklen die Bindungstemperatur von der berechneten *Mismatch-T_m* (– 5 °C) auf die *Perfect Match-T_m* (– 5 °C) des Primers erhöht worden. Für Kolonie-PCR wurde anstatt eines aufgereinigten DNA-Templates ein wenig einer frischen Hefe- oder *E. coli*-Kolonie in den Reaktionsansatz gegeben.²

2.1.3 Homologe Rekombination in Hefe

Für die Integration eines PCR- oder Plasmid-Fragments in einen Vektor mittels homologer Rekombination in Hefe wurde zunächst der Vektor linearisiert. Insofern es möglich war, wurden hierbei zwei Restriktionsenzyme eingesetzt, die zu inkompatiblen Überhängen beidseitig der Vektor-Enden führen. Der Vektor wurde nach der Dephosphorylierung durch SAP mittels eines Agarosegels aufgereinigt. Ein Fragment, das beidseitig Sequenzen von mindestens 40 bp Länge aufweist, die homolog zum aufgereinigten Vektor sind, wurde zusammen mit diesem Vektor für die Transformation von Hefe verwendet (**Abschnitt 2.5.3**). Als negative Kontrolle erfolgte die Transformation mit dem linearisierten Vektor alleine. Positive Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert (**Abschnitt 2.1.2**).

2.1.4 Plasmidisolierung aus Hefe

Zur Isolation von Plasmiden aus Hefe wurde eine Methode von A. Lorincz (Bethesda Research Laboratories)³ angewendet, die für die Isolation von Vektoren angepasst wurde, die nur in ein bis zwei Kopien in der Hefezelle vorliegen. Hierzu wurden 2 ml *Supplement Complete* (SC)-Selektionsmedium mit einer frischen Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Zentrifugation (22000 × g, 1 min) wurden die Zellen in 500 µl Lysis-Puffer aufgenommen (10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (m/V) SDS) und bis unter den Flüssigkeitsmeniskus mit Säure-gewaschenen Glasperlen (∅ 0,45–0,6 µm, s. Sambrook und Russel, 2001) versetzt. Die 2 ml Reaktionsgefäße wurden daraufhin 5 min mit einem Schüttler (Vortex) bei max. Geschwindigkeit geschüttelt. Hierzu wurden 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 50:24:1) gegeben und die Gefäße ein weiteres Mal für 1 min geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (22000 × g, 1 min) wurden 400 µl vom Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Um die DNA der aufgeschlossenen Hefen ein zweites Mal zu extrahieren, wurden die verbliebenen 100 µl der wässrigen Phase mit 350 µl frischem Lysispuffer ergänzt. Nach der zweiten Extraktion wurden die wässrigen Überstände vereint (≈800 µl) und verbliebenes Phenol durch Waschen mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc pH 5,2, 1/100 Vol. 1 M MgCl₂ und 2 Vol. Ethanol

²Ein spezieller Aufschluss der Hefezellen war nicht notwendig, insofern frisch transformierte Hefezellen verwendet wurden.

³Quelle: Hahn Lab. http://www.fhcrc.org/labs/hahn/methods/mol_bio_meth/yeast_plas_prep.html

gefällt, zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen und in 30 μl H_2O gelöst. Zur Amplifikation der Plasmide wurden hiervon 5 μl für die Transformation von hochkompetenten *E. coli*-Zellen (mind. 10^9 colony forming units (cfu)/ μg pUC18) mittels Elektroporation eingesetzt. Alternativ wurde für PCRs 0,5 μl der DNA pro 25 μl Reaktionsansatz eingesetzt.

2.1.5 Isolierung der cDNA der Interaktionskandidaten aus Hefe; Retransformation von Hefe

Die cDNA der mit dem SUS identifizierte(n) Kandidaten in den *Prey*-Plasmiden pGOi bzw. pCUP-CGK (SUS-cDNA-Bibliotheken, s. **Abschnitt 2.2**) wurde für die Retransformation von Hefe auf zwei unterschiedlichen Wegen erhalten: Zum einen wurde das Plasmidgemisch aus den Hefen isoliert und *E. coli* damit transformiert (**Abschnitt 2.1.4**). Obwohl ein *Bait/Prey*-Plasmidgemisch für die Transformation verwendet wird, ist die Selektion von *Prey*-Vektor-(pCUP-CGK)-Transformanten im Fall der LD-Bibliothek möglich, da nur diese resistent gegenüber Kanamycin sind. Dies ist im Fall der FS-Bibliothek nicht möglich, da die *Bait/Prey*-Plasmide keine unterschiedlichen Resistenzmarker aufweisen. Hier wurde mittels PCR nach der Plasmidisolierung (**Abschnitt 2.1.4**) oder durch Kolonie-PCR (**Abschnitt 2.1.2**) die im Vektor pGOi enthaltene cDNA des Kandidaten mit den Primern Nui (5'-GATTTTCGTCAAGACTTTGACCGGTA-3') und ADH1term (5'-GTTACATAAAAGAAGGCCAAAACGATG-3') amplifiziert. Gleichzeitig wurden hierbei beidseitig der cDNA ≈ 100 bp der pGOi-Vektorsequenz amplifiziert. Bei den Screens 1–4 (**Tabelle 3.1**) wurde dies auch für Kandidaten aus der LD-Bibliothek getan. Hierbei erfolgte die Amplifikation der cDNAs mit den Primern Nui und Cyc1r (5'-TTTCGGTTAGAGCGGATGTG-3'), wodurch ebenfalls ≈ 100 bp des Trägervektors (hier pCUP-CGK) amplifiziert wurden. Für die Retransformation von Hefe wurde neben dem *Bait*-Konstrukt, mit dem der Kandidat identifiziert wurde, der in *E. coli* amplifizierte *Prey*-Vektor verwendet, oder der *Prey*-Vektor wurde in Hefe mittels homologer Rekombination rekonstruiert (**Abschnitt 2.1.3, 2.5.3**).

2.1.6 Rapid Amplification of cDNA-Sequences (RACE)

Für 5'-*Rapid Amplification of cDNA-Sequences* (RACE) wurde eine cDNA-Bibliothek mit Material aus verschiedenen Geweben von *A. thaliana* hergestellt. Hierzu wurden folgende Gewebe vereint:

- 300 mg Gewebe von auf Erde gewachsenen, einen Monat alten Pflanzen, inklusive Blütenstände, Schoten und Blütenstengel
- 600 mg Wurzeln und 500 mg oberirdisches Pflanzenmaterial von hydroponisch gewachsenen Pflanzen, die für 3 Tage mit 100 μM Zn behandelt wurden
- 300 mg Wurzeln von hydroponisch gewachsenen Pflanzen, die für 2 Tage mit 30 μM Zn behandelt wurden

- 300 mg Wurzeln von hydroponisch gewachsenen Pflanzen, die für 2 Tage 3 μM Cd ausgesetzt wurden

Aus den vereinten Geweben wurde mit der TRIzol-Methode (Invitrogen) entsprechend der Anleitung des Herstellers 1 mg Gesamt-RNA isoliert, woraus 2 μg mRNA mit dem POLYTRACT System (Promega Corp., Madison, WI, USA) präpariert wurden. Die 5'-RACE-Bibliothek wurde unter Benutzung von 0,5 μg mRNA mit dem SMARTTM RACE cDNA-AMPLIFICATION-Kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) hergestellt. Für die 5'-RACE von *AtMTP12* wurde PCR und *nested* PCR mit den genspezifischen Primern AtCDF5-5Ra (5'-GCAACGGAATGACTGAAGCGATGATG-3') und AtCDF5-5Rb (5'-CAACACTCCCCATTGTGTCTGC-3', *nested*) durchgeführt. Als Template wurden hierbei 2,5 μl der Bibliothek bzw. 1 μl der ersten PCR im Fall der *nested* PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die identifizierten Banden mit einer Größe von $\approx 2200/2100$ bp (PCR/*nested* PCR) wurden in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Nach der Transformation von *E. coli* wurden neun Klone sequenziert, die aus der Transformation mit dem *nested* PCR-Produkt hervorgingen sowie zwei Klone der zweiten Transformation (Sequenzen in Anhang A.1.2).

2.1.7 Klonierung von *AtAKT1*

Aus der *A. thaliana* 5'-RACE cDNA-Bibliothek wurde mit den Primern GWAtAKT1f (5'-CACC-ATGAGAGGAGGGCTTTGTTATGC-3') und GWAtAKT1r (5'-TTAAGAATCAGTTGCAAAGATGAGATG-3') die kodierende Sequenz von *AtAKT1* mit Stop-Codon amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers in den Gateway[®]-Vektor pENTR/D (Invitrogen) kloniert. Das entsprechende Konstrukt mit Stop-Codon im Vektor pDOR201 wurde zuvor bereits von A.-G Desbrosses-Fonrouge⁴ erzeugt (nicht publiziert). Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Klonierung von *AtAKT1* mit Stop-Codon in pNubAGW-L und ohne Stop-Codon in pM-Cub erfolgte mit der Gateway[®]-Technologie.

2.1.8 Klonierung von *AtMTP1*

Aus der *A. thaliana* 5'-RACE cDNA-Bibliothek wurde mit den Primern ZAT1tpA 5'-CACCATGG-AGTCTTCAAGTCCCCACC-3' und ZAT1tpX 5'-GCGCTCGATTTGTATCGTGACATG-3' die kodierende Sequenz von *AtMTP1* ohne Stop-Codon amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers in den Gateway[®]-Vektor pENTR/D (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Das entsprechende Konstrukt mit Stop-Codon im Vektor pDONR201 wurde zuvor bereits von A.-G. Garlonn Desbrosses-Fonrouge erzeugt (nicht publiziert). Die Klonie-

⁴Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie

rung von *AtMTP1* ohne Stop-Codon in pM-Cub und von *AtMTP1* mit Stop-Codon in pNubAGW-L erfolgte mit der Gateway®-Technologie.

2.1.9 Klonierung von *AbMTP1*

Für die Klonierung von *AbMTP1* mit Stop-Codon in den Vektor pNubAGW-L mittels der Gateway®-Technologie wurde das Gateway®-Entry-Konstrukt von *AbMTP1* verwendet, dessen Konstruktion in Dräger *et al.* (2004) beschrieben wurde.

2.1.10 Klonierung von *AtMTP2*

Aus der *A. thaliana* 5'-RACE cDNA-Bibliothek wurde mit den Primern ZAT2tpA (5'-ATGGATTC-AAGAAGAAGTAAAGTTTG-3') und ZAT2tpX (5'-GCTCGATTGTATCGTAACGTGA-3') die kodierende Sequenz von *AtMTP2* ohne Stop-Codon amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers in den Gateway®-Vektor pENTR/D (Invitrogen) kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Das entsprechende Konstrukt mit Stop-Codon wurde zuvor bereits von A.-G. Desbrosses-Fonrouge erzeugt (nicht publiziert).

2.1.11 Klonierung von *AtMTP3*

Für die Klonierung von *AtMTP3* ohne Stop-Codon in den Vektor pM-Cub mittels der Gateway®-Technologie wurde das Gateway®-Entry-Konstrukt von *AtMTP1* verwendet, dessen Konstruktion in Arrivault *et al.* (2006) beschrieben wurde.

2.1.12 Klonierung von *AtMTP12*

Die Klonierung von *AtMTP12* erfolgte mittels homologer Rekombination in Hefe (Abschnitt 2.1.3, 2.5.3). Durch überlange Primer wurden beidseitig der kodierenden *AtMTP12*-Sequenz mittels PCR Sequenzen eingeführt, die homolog zu den *attB1* und *attB2* Rekombinationsstellen von Gateway®-Expressionsvektoren sind.⁵ Für die Amplifikation von *AtMTP12* ohne Stop-Codon mit den Primern GWHR-AtCDF5f (5'-GTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCGCATCAACAAC-AATGGTGGATC-3') und GWHR-AtCDF5r (5'-CCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCGCGCCC-ACCCTTTGAGTTAACAGATTCCACCTGCAATG-3') wurde dieselbe *A. thaliana* cDNA-Bibliothek verwendet, wie zuvor für 5'-RACE. Der für die homologe Rekombination eingesetzte Vektor pM-Cub

⁵Für die Erzeugung der Expressionsvektoren (LR-Reaktion) muss pENTR/D verwendet werden, um die unterstrichenen attB-Seiten zu erhalten. Würde stattdessen ein pDONR Vektor verwendet, fehlt nach der LR-Reaktion in der attB1 Seite des Expressionsvektors die Sequenz 5'-CGCGGCCGCCCTTCACC-3' und in der attB2 Seite die Sequenz 5'-GGGTGGGCGCGCGCA-3'. Die Klonierung von cDNAs in den Vektor pENTR/D ist die neuere der beiden grundsätzlich verschiedenen Technologien, cDNAs in das Gateway®-System einzuführen.

enthielt *AtMTP1* (**Abschnitt 2.2**), welches zuvor unter Verwendung des pENTR/D (*AtMTP1*)-Konstruktes mit dem Gateway®-System in diesen Vektor kloniert wurde. Die für die homologe Rekombination notwendige Linearisierung des Vektors (**Abschnitt 2.1.3**) wurde mit *BlnI* durchgeführt, wodurch ein Großteil der *AtMTP1* Sequenz entfernt wurde.

2.1.13 Klonierung der Interaktionskandidaten

Da die Kandidaten des Interaktionsscreens (**Tabelle 3.2**) zumeist verkürzt im *Prey*-Vektor vorlagen, wurden diese neu kloniert. Der annotierte *Open Reading Frame* (ORF) wurde hierfür unter Verwendung der *A. thaliana* 5'-RACE cDNA-Bibliothek mit den in **Anhang A.1.3** aufgelisteten Primern inkl. Stop-Codon amplifiziert. Die Amplifikate wurden in den Gateway®-Vektor pENTR/D kloniert. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, dass die Sequenzen fehlerfrei vorlagen. Die Klonierung in pFL61GW, pNubAGW und pNubGGW erfolgte mit der Gateway®-Technologie.

2.1.14 Southern Blot der *mtp2-S3*-Linie

Genomische DNA wurde mit einer modifizierten Methode gemäß Murray und Thompson (1980) isoliert. Es wurden 1 g Blüten in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver zerrieben und in 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Gefäße wurden nach der Zugabe von 5 ml Extraktionspuffer (140 mM Sorbitol, 22 mM EDTA, 800 mM NaCl, 1 % (m/V) N-Lauryl Sarcosin) geschüttelt (Vortex), bis eine homogene Suspension erhalten wurde. Nach der Zugabe von 5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 50:24:1) wurden die Gefäße für weitere 3 min geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 11 000 × g, 4 °C) wurde der wässrige Überstand (≈ 5 ml) in saubere 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt und hierzu vorsichtig 5 ml Isopropanol gegeben. Die Gefäße wurden vorsichtig dreimal invertiert und 5 min bei 20–25 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (10 min, 11 000 × g) entfernt und das Pellet für 2–3 min getrocknet. Die RNA wurde verdaut durch Zugabe von 5 ml H₂O + 0,2 mg · ml⁻¹ RNase und Inkubation bei 37 °C für 15 min. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugieren (10 min, 11 000 × g) entfernt, der Überstand (5 ml) in ein neues Gefäß überführt und die gDNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc pH 5,2, 1/100 Vol. 1 M MgCl₂ und 2 Vol. Ethanol gefällt. Die Gefäße wurden 5 min bei 20–25 °C inkubiert, woraufhin die gDNA durch Zentrifugieren (30 min, 11 000 × g) pelletiert und nach dem Entfernen des Überstands getrocknet wurde. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 µl H₂O gelöst. Zehn Mikrogramm der gDNA wurden mit *XbaI* verdaut und die entstehenden Fragmente elektrophoretisch in einem 0,6%igem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und nach dem Anlegen eines fluoreszierenden Lineals fotografiert. Nach dem *Blot* der DNA (Kapillar-*Blot* mit SSC-Puffer (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat pH 7 gemäß Sambrook und Russel, 2001) auf eine Pall-B-Membran (Pall Life Sciences, Dreieich, Deutschland) erfolgte die Fixierung der DNA mit UV-Licht (*Cross-linking*). Die Membran

wurde daraufhin mit Wasser angefeuchtet und 2 h bei 65 °C in Herby-Puffer (250 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA, 6,6 % (m/V) SDS, 1 % (m/V) BSA) vorhybridisiert. Durch Restriktionsverdau von pBIN-ROK2 (Baulcombe *et al.*, 1986) mit *Bsa*BI/*Bst*BI wurde das *NPTII*-Gen als Fragment mit einer Größe von 825 bp erhalten. Die radioaktive Markierung (³²P) von 25 ng DNA dieses Fragments erfolgte mit dem MEGAPRIME-Kit (GE Healthcare, ehem. Amersham Biosciences; nicht mehr erhältlich). Zur Hybridisierung wurde die Sonde für 4 h bei 60 °C in Herby-Puffer mit der Membran inkubiert. Daraufhin wurde die Membran einmal mit 3× SSC + 0,5 % (m/V) SDS gewaschen (20 min, 60 °C), gefolgt von einem zweiten Waschschrift mit 0,5× SSC + 0,5 % (m/V) SDS (20 min, 42 °C). Die Detektion der membrangebundenen Radioaktivität erfolgte mit dem KODAK SCIENTIFIC IMAGING FILM X-OMAT™ AR. Der Film wurde exponiert, bis ein gutes Signal zu erkennen war (≈ 2 Wochen).

2.2 Hefe-Vektoren, Klonierungen

2.2.1 N_{ub}/*Prey*-Vektoren

Alle N_{ub}-Vektoren gehen auf Johnsson und Varshavsky (1994) zurück, wurden aber unterschiedlich modifiziert. Unter anderem ergeben sich hierdurch unterschiedliche *Linker*-Sequenzen zwischen N_{ub} und den cDNAs (s. **Anhang A.2**). Gemeinsam ist allen Vektoren, dass sie auf dem Grundgerüst von pRS314 aufbauen (Sikorski und Hieter, 1989) und daher aufgrund des *ARSH4/CEN6*-Replikationsursprungs in Hefe in ein bis zwei Kopien vorliegen (*low copy*-Vektoren).⁶ Da in allen Vektoren die *pCUP1::N_{ub}*-Kassette von Johnsson und Varshavsky (1994) enthalten ist, steht bei diesen Vektoren die Expression der chimären Fusionsproteine unter Kontrolle des *pCUP1* Promotors.

pGOi (*pCUP1::N_{ub}::cDNA*): SUS-cDNA-Bibliothek (FS-Bib.) Eine der beiden mit dem SUS gescreenten cDNA-Bibliotheken wurde von Felippa Santos⁷ erhalten (FS-Bibliothek). Für die Konstruktion der Bibliothek wurde der Vektor pGOi aus mehreren Plasmiden konstruiert: Für die Erzeugung von pGOi wurde der Promotor *pCUP1* und die N_{ub}-kodierende Sequenz gemeinsam von dem von Johnsson und Varshavsky (1994) abstammenden N_{ubI}-Vektor amplifiziert. Durch überlange Primer wurde *upstream* von *pCUP1* eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Sac*I eingeführt. *Downstream* von N_{ub} wurde ein *Haemagglutinin* (HA)-Epitop-*Tag* sowie die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Asc*I, *Sma*I, *Bam*HI and *Sal*I eingeführt (Sequenz s. **Anhang A.2**). Dieses PCR-Fragment wurde mit *Sac*I und *Sal*I verdaut und in den ebenso verdauten Vektor pRS314 eingefügt. Vom Vektor pGAD424 (Bartel *et al.*, 1993) wurde die Sequenz des *ADHI*-

⁶Da auch der *Bait*-Vektor diesen Replikationsursprung hat (pRS313-Grundgerüst), liegt von jedem Vektor unter Selektionsbedingungen nur ein Plasmid in der Hefezelle vor.

⁷Universität Freiburg, Pflanzenbiotechnologie, AG Palme, Sonnenstr. 5, 79104 Freiburg

Terminators amplifiziert. Hierbei wurden durch überlange Primer *upstream* der *ADHI*-Terminatorsequenz die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *ApaI*, *NotI* und *BglII* eingeführt und *downstream* eine *KpnI*-Erkennungssequenz. Dieses PCR-Fragment wurde *ApaI/KpnI* verdaut und unter Benutzung dieser Restriktionsschnittstellen *downstream* bezüglich des zuvor in den Vektor pRS314 eingefügten N_{ub} -Fragments kloniert. Der somit erhaltene Vektor wurde pGOi genannt. Er liegt aufgrund des *ARSH4/CEN6*-Replikationsursprung in Hefe in ein bis zwei Kopien vor (*low copy*-Vektor). Er enthält den Auxotrophiemarker *TRP1*, sowie den *pCUP1*-Promotor und den *ADHI*-Terminator zur Expression von cDNAs in *S. cerevisiae*. Die Selektion erfolgt in *E. coli* durch $60 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ampicillin bzw. Carbenicillin.

Für die Konstruktion der Bibliothek wurde Gewebe von *A. thaliana*-Zellkulturen, oberirdische Teile von vier bis sechs Wochen alten Gewächshauspflanzen und Wurzeln von vier bis sechs Wochen alten hydroponisch gewachsenen Pflanzen verwendet. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNEASY MAXI-Kit (Quiagen) isoliert und hieraus über vorgepackte oligo(dT)-Zellulose-Zentrifugationssäulen (GE Healthcare, ehem. Amersham Biosciences) mRNA präpariert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem SUPERSCRIPT PLASMID SYSTEM (Invitrogen). Diese cDNA wurde über *SalI/NotI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGOi kloniert.

pCup-CGK (*pCUP1::N_{ub}:cDNA*): SUS-cDNA-Bibliothek (LD-Bib.) Die zweite der beiden mit dem SUS gescreenten cDNA-Bibliotheken wurde von Laurent Deslandes⁸ erhalten (LD-Bibliothek). Der hierbei eingesetzte Vektor pCUP-CGK geht auf denselben *Prey*-Vektor (pNub) von Johnsson und Varshavsky (1994) zurück, wie der für die Konstruktion von pGOi eingesetzte Vektor. Der Vektor wurde stark modifiziert (Deslandes *et al.*, 2003): Durch einen zusätzlichen bakteriellen Marker kann die Selektion in *E. coli* neben Ampicillin auch mittels $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Kanamycin erfolgen. Zudem wurden durch einen synthetischen *Linker* mittels komplementärer Primer *attB1*- und *attB2*-Seiten eingeführt, wodurch der Vektor kompatibel mit dem Gateway[®]-System ist. Er enthält den Auxotrophiemarker *TRP1*, sowie den *pCUP1*-Promotor und den *CYC1*-Terminator zur Expression von cDNAs in *S. cerevisiae*.

Für die Konstruktion der cDNA-Bibliothek wurde mRNA aus Blüten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Unter Benutzung der *EcoRI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen zwischen den *attB1* und *attB2*-Seiten wurde die cDNA in den Vektor pCUP-CGK kloniert.

pNubGGW, pNubAGW, pNubIGW (*pCUP1::N_{ubG/AT}:cDNA*) Diese Vektoren stammen ebenfalls von Johnsson und Varshavsky (1994) und wurden von Craig Wood⁹ für das Gateway[®]-System erweitert (nicht publiziert). Hierzu wurden die entsprechenden N_{ub} -Vektoren mit *ClaI/BamHI* verdaut

⁸Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, AG Sommsich, Abteilung Biochemie, Carl-von-Linne-Weg 10, 50829 Köln

⁹CSIRO Plant Industry, Australien

und die 3'-Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die Gateway®-Kassette rfa (Invitrogen) wurde daraufhin *blunt* eingefügt. Mit Ausnahme des zweiten Antibiotika-Resistenzgens besitzen diese Vektoren alle Merkmale des Vektors pCUP-CGK.

pNubAGW-L (*pCUP1::Nub:cDNA*) Durch Austausch des Auxotrophiemarkers von pNubAGW wurde von Baomin Feng¹⁰ (nicht publiziert) der Vektor pNUBA-GW-L erzeugt. Hierzu wurde mittels PCR vom Vektor pRS305 (Sikorski und Hieter, 1989) *LEU2* inkl. Promotor und Terminator amplifiziert und gleichzeitig durch die Primer 5'-CCCCTACGTAGCGGTATTTTCTCCTTACGCAA-3' und 5'-CCCCAAGCTTTCGACTACGTCGTAAGGCCGT-3' die Erkennungssequenzen für *HindIII* und *SnaBI* eingeführt. Unter Benutzung dieser Restriktionsschnittstellen wurde das PCR-Produkt in den Vektor pNubAGW eingefügt. Mit Ausnahme des ausgetauschten Auxotrophiemarkers verfügt der Vektor pNubAGW-L über dieselben Merkmale wie pNubAGW.

2.2.2 C_{ub}/Bait-Vektor

pM-Cub (*pMET25::cDNA:C_{ub}*) Für die Konstruktion von pM-Cub wurde das pRS313 basierte Konstrukt *STE14-Cub-RURA3* (Nils Johnsson¹¹, nicht publiziert, wurde analog zu dem von Wittke *et al.*, 1999, beschriebenen pRS315 basierten Konstrukt konstruiert) von Craig Wood für das Gateway®-System erweitert (nicht publiziert). Hierzu wurde das Konstrukt *Clai/SalI* verdaut und die 3'-Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Nach der Dephosphorylierung der Enden wurde die Gateway®-Kassette rfb (Invitrogen) *blunt* eingefügt. Die Orientierung der Kassette wurde durch Restriktionsverdau mit *NotI* überprüft.

2.2.3 Hefe-Expressionsvektoren

pFL61GW (*pPGK1::cDNA*) Der Vektor pFL61GW ist die Gateway®-kompatible Version des Vektors pFL61 (Minet *et al.*, 1992): Hierfür wurde pFL61 mit *NotI* linearisiert und die 3'-Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die Gateway®-Kassette rfC.1 (Invitrogen) wurde daraufhin *blunt* eingefügt (A.-G. Desbrosses-Fonrouge, nicht publiziert). Alle Varianten des Vektors pFL61 liegen aufgrund des 2 μ -Replikationsursprungs in Hefe in mehreren Kopien vor (*multi copy*-Vektor). Sie enthalten den Auxotrophiemarker *URA3*, sowie den Promotor und Terminator des *Phosphoglyceratkinase 1* (PGK1)-Gens zur Expression von cDNAs in *S. cerevisiae*. Das in *E. coli* toxische *ccdB*-Gen der Gateway®-Kassette hatte in Hefe keinen Effekt auf das Wachstum, wenn die Vektoren als Leervektoren eingesetzt wurden. In diesen Vektor wurde die kodierende Sequenz von *AtMTP2* mit

¹⁰Pennsylvania State University, Biology Department, University Park, USA

¹¹Universität Münster, Institut für medizinische Biochemie, Von-Esmarch-Str. 56 48149 Münster

Stop-Codon mittels der Gateway[®]-Technologie kloniert. Die Selektion von *E. coli*-Transformanten erfolgte durch 60 µg · ml⁻¹ Ampicillin bzw. Carbenicillin.

pFL613GW (pPGK1::3×HA:cDNA) Durch Klonierung von cDNAs in den Vektor pFL613GW mit der Gateway[®]-Technologie wird eine translationale Fusion des kodierten Proteins mit dem N-terminalen Epitop-Tag 3× HA erzeugt (Dräger *et al.*, 2004). Die kodierenden Sequenzen der in **Tabelle 3.2** aufgelisteten Kandidaten des Interaktionsscreens wurden mit Stop-Codon in diesen Vektor kloniert. Die Selektion von *E. coli*-Transformanten erfolgte durch 60 µg · ml⁻¹ Ampicillin bzw. Carbenicillin.

pFL38GW-H (pPGK1::cDNA) Für die Konstruktion des Vektors pFL38GW-H wurde der Vektor pFL38 (Bach *et al.*, 1979) modifiziert (A.-G. Desbrosses-Fonrouge, nicht publiziert). Aus dem Vektor pFL61 (Minet *et al.*, 1992) wurde eine Kasette bestehend aus dem PGK1-Promotor und Terminator mit *SmaI/BglI* ausgeschnitten und unter Benutzung dieser Restriktionsschnittstellen in den Vektor pFL38 eingefügt. Dieses Konstrukt wurde mit *NotI* linearisiert und die Gateway[®]-Kasette rfC.1 (Invitrogen) eingefügt. Die Orientierung der Kasette wurde mittels Restriktionsverdau überprüft. Für den Austausch des Auxotrophiemarkers *URA3* wurde das entstandene Konstrukt (pFL38GW) mit *BglII* linearisiert und die 3'-Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Eine *HIS3*-Kasette wurde als *BamHI*-Fragment des Vektors YDp-H (Gilbert Berben, 1991) erhalten. Nach dem Auffüllen der 3'-Überhänge wurde die beiden Fragmente *blunt* ligiert. Die Expression von cDNAs steht im entstandenen Vektor pFL38GW-H somit wie bei pFL61 unter der Kontrolle des PGK1-Promotor. Im Gegensatz zu diesem handelt es sich aber um einen *low copy*-Vektor (*CEN6*) und der Vektor kodiert statt des *URA3*- den *HIS3*-Auxotrophiemarker. Die Selektion von *E. coli*-Transformanten erfolgte durch 60 µg · ml⁻¹ Ampicillin bzw. Carbenicillin.

pUG35GW (pMET25::cDNA:yEGFP) Der Vektor pUG35GW ist die Gateway[®]-kompatible Version des Vektors pUG35 (Güldener und Hegemann, 1998): Hierfür wurde pUG35 mit *SmaI* linearisiert und die Gateway[®]-Kasette rfB (Invitrogen) *blunt* eingefügt (Craig Wood, nicht publiziert). Durch Klonierung von cDNAs in diesen Vektor wird eine translationale Fusion des *Yeast Enhanced Green Fluorescing Protein* (yEGFP) an den C-Terminus des kodierten Proteins erhalten. Der Vektor liegt aufgrund des *ARSH4/CEN6*-Replikationsursprungs in Hefe in ein bis zwei Kopien vor (*low copy*-Vektor). Er enthält den Auxotrophiemarker *URA3*, sowie den Methionin reprimierten *pMET25*-Promotor und den *CYC1*-Terminator zur Expression von cDNAs in *S. cerevisiae*. In diesen Vektor wurde die kodierende Sequenz von *AtMTP2* mit Stop-Codon mittels der Gateway[®]-Technologie kloniert. Die Selektion von *E. coli*-Transformanten erfolgte durch 60 µg · ml⁻¹ Ampicillin bzw. Carbenicillin.

2.3 Pflanzen-Expressionsvektoren, Klonierungen

pGPTV-Kan (*cDNA:uidA*) Der Vektor dient der Untersuchung der Promotoraktivität von Sequenzen, die *upstream* des 5'-Terminus vom GUS-Reportergen *uidA* kloniert werden. Mittels PCR wurde von genomischer *A. thaliana*-DNA mit den Primern 5'-GCTAGCTAACCATTACATACC-3' und 5'-GC-CGGCCATAACTCTGTCGC-3' ein Sequenz-Fragment mit einer Größe von 2542 bp amplifiziert, das die Promotorregion von *AtMTP2*, die 182 bp umfassende 5'-*Untranslated Region* (UTR), ein Intron von 93 bp Größe sowie 281 bp der kodierenden *AtMTP2*-Sequenz enthielt. Unter Benutzung der hierbei eingeführten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NheI* und *NgoMVI* wurde das Fragment in den *XbaI* und *XmaI* verdauten Vektor pGPTV-Kan kloniert (DNA Klonierungsservice, Herman Schmidt, Hamburg, Deutschland). Die kodierende *AtMTP2*-Sequenz umfasst die ersten beiden Transmembranhelices. Die transformierten Sämlinge wurden auf Kanamycin-Resistenz selektiert.

pK7FWG2 (*p35S::cDNA:EGFP*) Der binäre Vektor pK7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) wurde erzeugt, um eine translationale Fusion von EGFP an den C-Terminus eines Proteins zu erhalten, das von einer mit der Gateway[®]-Technologie klonierten cDNA kodiert wird. Der Vektor enthält den Promotor und Terminator von *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) 35S. Die kodierende Sequenz von *AtMTP2* wurde ohne Stop-Codon in diesen Vektor kloniert. Die Selektion von Transformanten erfolgt in *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*) mit 50 µg · ml⁻¹ bzw. 100 µg · ml⁻¹ Spectinomycin und in Pflanzen mit 50 µg · ml⁻¹ Kanamycin. Zur Expression des *AtMTP2*-EGFP-Fusionsproteins unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors wurde dieses *AtMTP2*-pK7FWG2-Konstrukt modifiziert: Durch Restriktionsverdau mit *SacI/AscI* wurde ein verkürztes Vektorfragment mit einer Größe von 9 137 bp erhalten. Das verworfene Fragment mit einer Größe von 2 121 bp umfasste den *p35S*-Promotor sowie die gesamte kodierende *AtMTP2*-Sequenz. Mittels PCR wurde von *A. thaliana*-gDNA mit den Primern pCDF2f*SacI* (5'-GAGCTCTTTGATGGCGTTTAGCATCG-3') und pCDF2r*AscI* (5'-GGCGCGCCACGCTCGATTTGTATCGTAACG-3') ein Fragment mit einer Größe von 2 294 bp amplifiziert. Dieses Fragment enthält die Sequenz der 1 277 bp umfassenden Region zwischen dem 3'-Ende der mRNA-kodierenden Sequenz von At3g61930¹² und dem translationalen Startcodon von *AtMTP2* (At3g61940), sowie die kodierende *AtMTP2*-Sequenz. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert und die Sequenz durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Nach dem Restriktionsverdau dieses Konstrukt mit *SacI/AscI* wurde ein Fragment mit einer Größe von 2 283 bp erhalten, das mit dem zuvor erzeugten *SacI/AscI*-pK7FWG2-Vektorfragment mit einer Größe von 9 137 bp ligiert wurde.

¹²unterstützt durch cDNAs und ESTs: Acc.Nr. gi|28973092, gi|26451344, gi|19798970, gi|19878167, gi|28197634

pK7WGF2 (*p35S::EGFP:cDNA*) Der binäre Vektor pK7WGF2 (Karimi *et al.*, 2002) ist analog zu pK7FWG2, nur dass hier eine translationale Fusion von EGFP an den *N-Terminus* eines Proteins erhalten wird. Die kodierende Sequenz von *AtMTP2* wurde mit Stop-Codon von A.-G. Desbrosses-Fonrouge mittels der Gateway®-Technologie in diesen Vektor kloniert (nicht publiziert). Zur Expression des EGFP-*AtMTP2*-Fusionsproteins unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors wurde dieses Konstrukt modifiziert: Durch Restriktionsverdau mit *SacI/SpeI* wurde ein verkürztes Vektorfragment mit einer Größe von 10203 bp erhalten, wobei das verworfene Fragment mit einer Größe von 1054 bp den *p35S*-Promotor umfasste. Mittels PCR wurde von genomischer *A. thaliana*-DNA mit den Primern pCDF2f*SacI* (5'-GAGCTCTTTGATGGCGTTTTAGCATCG-3') und pCDF2r*SpeI* (5'-AC-TAGTCTGCAGCAAAAAAGATTGTAACCTTTAG-3') ein Fragment mit einer Größe von 1289 bp amplifiziert. Dieses Fragment enthält die Sequenz der 1277 bp umfassenden Region zwischen dem 3'-Ende der mRNA-kodierenden Sequenz von At3g61930¹² und dem translationalen Startcodon von *AtMTP2* (At3g61940). Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert und die Sequenz durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Nach dem Restriktionsverdau dieses Konstrukts mit *SacI/SpeI* wurde ein Fragment mit einer Größe von 1279 bp erhalten, das mit dem zuvor erzeugten *SacI/SpeI*-pK7WGF2-Vektorfragment mit einer Größe von 10203 bp ligiert wurde.

pA7-p35S-N-GFP (*p35S::RSSmGFP:cDNA*) Der Vektor pA7-p35S-N-GFP wurde erzeugt (Karin Czempinsky¹³), um eine translationale Fusion von *Red-shifted soluble modified* GFP (RSSmGFP) (Davis und Vierstra, 1998; Haseloff *et al.*, 1997) an den N-Terminus eines Proteins zu erhalten. Der Vektor wurde angepasst für Klonierungen mit dem Gateway®-System (Ben Trevaskis¹⁴). Der Vektor enthält den CaMV-*p35S*-Promotor und den *NOS3*-Terminator zur Expression von cDNAs in Pflanzenzellen. Die Selektion von *E. coli*-Transformanten erfolgte durch 60 µg · ml⁻¹ Ampicillin bzw. Carbenicillin. Die kodierende Sequenz von *AtMTP2* wurde mit Stop-Codon mit der Gateway®-Technologie von A.-G. Desbrosses-Fonrouge in diesen Vektor kloniert (nicht publiziert).

pB7WG2 (*p35S::cDNA*) Der Vektor pB7WG2 (Karimi *et al.*, 2002) enthält den Promotor und Terminator von CaMV 35S zur Überexpression von cDNAs in Pflanzen. Die kodierende Sequenz von *AtMTP2* wurde mit Stop-Codon mit der Gateway®-Technologie von A.-G. Desbrosses-Fonrouge in diesen Vektor kloniert (nicht publiziert). Die Selektion von Transformanten erfolgt in *E. coli* und *Agrobacterium* mit 50 µg · ml⁻¹ bzw. 100 µg · ml⁻¹ Spectinomycin und in Pflanzen mit 25 µg · ml⁻¹ DL-Phosphinotricin.

¹³Universität Potsdam, Deutschland

¹⁴CSIRO Plant Industry, Canberra, Australien

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden 3 g frisches Blattmaterial geerntet und mit 30 ml vorgekühltem Homogenisierungspuffer (40 mM HEPES pH 7,5, 20 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 1 μM ZnSO₄, 1 % (m/V) Na-Ascorbat, 10 % (V/V) Glycerol, Proteaseinhibitor (*Complete-Mix*, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einem vorgekühltem Mixer homogenisiert (fünfmal 1 min bei max. Geschwindigkeit, 4 °C). Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Miracloth filtriert und für 10 min zentrifugiert (10000 × g, 4 °C). Der Überstand wurde ultrazentrifugiert (100000 × g, 1 h, 4 °C) und die mikrosomalen Membranen im Pellet in 600 μl Homogenisierungspuffer + 0,5 % Igepal (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst. Bei jedem Schritt wurden Aliquots entnommen. Die Auftrennung der Proteine in diesen Aliquots erfolgte gemäß ihrer molekularen Masse unter nativen Bedingungen mit der von Schrägger und Jagow (1991) beschriebenen Methode. Für das Gel wurde ein Gradient von 7,5–16,5 % Polyacrylamid (oben–unten) hergestellt.

2.4.2 Silberfärbung von Proteingelen

Silberfärbung von Proteingelen wurde mit einigen Modifizierungen wie von Blum *et al.* (1987) beschrieben durchgeführt. Zur Fixierung wurde das Gel dreimal 30 min in Ethanol/Essigsäure/Wasser¹⁵ (30:5:65, V/V/V) inkubiert und anschließend dreimal 10 min mit Wasser gewaschen. Die Sensibilisierung erfolgte durch Inkubation in 0,02%iger Na-Thiosulfatlösung (frisch hergestellt) für 1 min, woraufhin zweimal 1 min mit Wasser gewaschen wurde. Nach Imprägnierung mit Silbernitratlösung (25 ‰ Formaldehyd, 12,5 ‰ AgNO₃) für 30 min wurde darauf geachtet, höchstens 15 s (5–15 s) mit Wasser zu waschen. Die Inkubation mit Entwicklerlösung (3 % K₂CO₃, 10 ‰ Formaldehyd, 1 ‰ Na-Thiosulfat) erfolgte solange, bis das Proteingel hinreichend gefärbt war (1–10 min). Abgestoppt wurde durch mehrmaliges Spülen mit 1%iger Essigsäure, woraufhin einmal mit Wasser gewaschen wurde.

2.4.3 Western Blot

Vor dem Transfer der Proteine von einem nativen Proteingel auf eine Polyvinylidindifluorid-Membran (Immobilon™, Bedford, MA, USA) durch *electroblotting* (Towbin *et al.*, 1979) wurden die Proteine denaturiert: Hierzu wurde das Gel 30 min in Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Trenngelpuffer (375 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS pH 8,8) inkubiert. Die Membran wurde 4 h bei 20–25 °C mit 10 % (m/V) Milchpulver in PBST (80 mM Na₂HPO₄/20 mM KH₂PO₄ pH 7,3, 30 mM KCl, 150 mM NaCl, 0,1 % (V/V) Tween 20) blockiert und anschließend mit PBST kurz gewaschen. Der primäre anti-HA-Antikörper

¹⁵Für alle Puffer und Waschstschritte bis (inkl.) der Entwicklung wurde 18 MΩ-H₂O verwendet.

wurde in PBST + 1 % BSA verdünnt (1:2500) und mit der Membran 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal 10 min in PBST + 1 % BSA gewaschen. Für den kolorimetrischen Nachweis wurde ein anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat in der Verdünnung 1:5000 mit der Membran 1 h inkubiert, zweimal 5 min in PBST gewaschen, einmal 5 min mit PBS (PBST ohne Tween 20) und einmal 10 min in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). NBT/BCIP (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde entsprechend der Herstellerangabe in AP-Puffer verdünnt eingesetzt.

2.5 Hefe-Experimente

2.5.1 Verwendete Stämme

<i>ccc1</i>	MATa <i>ccc1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> (Chen und Kaplan, 2000); isogen zu BY4741
JD53	MATa <i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801</i> (Dohmen <i>et al.</i> , 1995)
<i>zrc1</i>	MATα <i>zrc1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> (MacDiarmid <i>et al.</i> , 2000); isogen zu BY4742
<i>ycf1</i>	MATα <i>ycf1::kanMX his3D1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> (Petrovic <i>et al.</i> , 2000); isogen zu BY4742
<i>zrc1 cot1</i>	MATa <i>zrc1::natMX4 cot1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> ; isogen zu BY4741, Abkömmling von <i>cot1</i> (MacDiarmid <i>et al.</i> , 2000). ¹⁶
BY4741 Wildtyp	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4742 Wildtyp	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)

2.5.2 Aminosäuremix

Für *Supplement Deficient* (SD)-Selektionsmedium wurden nur die Aminosäuren bzw. die Pyrimidinbase Uracil zugegeben, für die der verwendete Hefestamm bzw. die transformierten Hefezellen auxotroph sind. Für die Herstellung von *Supplement Complete* (SC)-Selektionsmedium wurden die im Folgenden aufgelisteten Aminosäuren bzw. die Pyrimidinbase Uracil (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in den angegebenen Endkonzentrationen eingesetzt: 20 mg · l⁻¹ Ade (Hemisulfat), 20 mg · l⁻¹ Arg (HCl), 100 mg · l⁻¹ Asp, 20 mg · l⁻¹ His (HCL Monohydrat), 80 mg · l⁻¹ Iso, 80 mg · l⁻¹ Leu, 60 mg · l⁻¹ Lys, 20 mg · l⁻¹ Met, 50 mg · l⁻¹ Phe, 200 mg · l⁻¹ Thr, 80 mg · l⁻¹ Trp, 20 mg · l⁻¹ Tyr, 20 mg · l⁻¹ Ura, 150 mg · l⁻¹ Val, 100 mg · l⁻¹ Glu und 40 mg · l⁻¹ Ser. Die zur Selektion von Transformanten weggelassenen Aminosäuren (bzw. Uracil) sind beim jeweiligen Experiment aufgelistet. Es wurde hierzu ein Mix hergestellt,

¹⁶Ausgehend von der *cot1* Mutante wurde die Doppelmутante von Christian Krach erzeugt (Krach, 2003)

der kein Uracil sowie alle obigen Aminosäuren außer Met, His, Trp und Leu enthält. Bei der Zubereitung des SC-Mediums wurde dieser Mix eingesetzt und entsprechend ergänzt.

2.5.3 Transformation von Hefe

Von Hefestämmen, die keine Plasmide enthielten, wurde eine 5 ml Übernachtskultur mit YPAD-Medium ($10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Bacto Hefe Extrakt, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Bacto Pepton, $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ D-Glukose, $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Adenine Hemisulfat) angesetzt. Anderenfalls wurde SC-Selektionsmedium verwendet. Hiermit wurde eine 50 ml Hauptkultur angeimpft und dabei durch spektrometrische Messung sichergestellt, dass die optische Dichte in der Nähe von $\text{OD}_{600} \approx 0,2$ war. Sobald die OD_{600} der Hauptkultur 0,6 erreichte, wurden die Hefezellen durch Zentrifugation ($1000 \times \text{g}$, 5 min) geerntet. Die Zellen wurden zunächst mit 25 ml H_2O gewaschen. Nach Zentrifugation ($1000 \times \text{g}$, 5 min) wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml 100 mM LiAc gelöst und gewaschen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ($10000 \times \text{g}$, 15 s) geerntet und vorsichtig in 0,5 ml 100 mM LiAc aufgenommen. Zu einem 50 oder 100 μl -Aliquot in einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde 50 μl $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Träger-DNA (aus Lachssperma) gegeben, die zuvor denaturiert wurde (5 min, 100°C). Die Menge der hierzu gegebenen Plasmide oder PCR-Produkte, mit denen der Hefestamm transformiert werden sollte, richtete sich nach der Art der Transformation (zu 50/100 μl Hefezellen zugegebenes Gesamtvolumen $\leq 5/10 \mu\text{l}$):

- A* Transformationen mit einer cDNA-Bibliothek: max. 1 μg Plasmid
- B* Transformationen mit einem Plasmid: 0,1–0,5 μg Plasmid
- C* Doppeltransformationen: äquimolare Mengen der beiden Plasmide bis je max. 0,5 μg
- D* Homologe Rekombination eines PCR-Produkts mit einem Plasmid: $\approx 100 \text{ ng}$ PCR-Produkt sowie $\approx 20 \text{ ng}$ Plasmid
- E* Drei DNA Quellen (PCR-Produkt, zwei Plasmide): $\approx 100 \text{ ng}$ PCR-Produkt sowie jeweils $\approx 20 \text{ ng}$ der Plasmide

Hierzu wurden 6 μl DMSO gegeben. Von der Transformationslösung (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 % (m/V) PEG 3350, 100 mM LiAc, 1 mM EDTA) wurden hierzu 520/750 μl gegeben (bei Verwendung von 50/100 μl Hefezellen), wobei auf gute und schnelle Durchmischung geachtet wurde. Die Transformationsansätze wurden in einem Wasserbad zunächst bei 30°C für 30 min inkubiert, woraufhin die Temperatur für weitere 30 min auf 42°C erhöht wurde. Im Fall des Hefestamms JD53 folgte hierauf für Hocheffizienz-Transformationen eine zusätzliche Inkubation bei 30°C für 1h. Die Reaktionsgefäße wurden alle 10 min dreimal invertiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet ($10000 \times \text{g}$, 15 s) und vorsichtig in 1 ml H_2O gelöst und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ($10000 \times \text{g}$, 15 s) wurden die Zellen wieder in 1 ml H_2O aufgenommen. Für Transformationen gemäß *B,C,D,E* wurden in dieser Reihenfolge zunehmende Mengen des Transformationsansatzes (200–1000 μl) auf SC-Selektionsmedium auf *einer* runden Platte (\varnothing 8 cm) plattiert. Im Fall von Hocheffi-

zienz-Transformationen gemäß *A* für Screens mit dem SUS wurde ein Transformationsansatz auf fünf Platten (quadratisch, 12 cm Kantenlänge) verteilt. Zudem wurden die Transformationsansätze und die Zahl der Platten skaliert: pro *Bait* 5× für die Screens Nr. 4 und 5 (Tabelle 3.1), pro *Bait* 10× für die Screens Nr. 1 und 6, sowie 2× für alle anderen Screens. Die Transformationsansätze wurden auf SD-Selektionsmedium + 1 mg · ml⁻¹ 5-Fluororotsäure (5-FOA) plattiert. Durch die Zugabe von 5-FOA aus einer frisch zubereiteten 10 mg · ml⁻¹-Stammlösung sank der pH-Wert auf ≈ 3. Der niedrige pH-Wert ist notwendig, da Hefezellen nur die protonierte Form von 5-FOA aufnehmen können (Abschnitt 3.1). In diesem Falle wurden für die Kontrolle der Transformationseffizienz 5 µl des Transformationsansatzes auf SD-Selektionsmedium ohne 5-FOA auf einer runden Platte plattiert, wobei zuvor der pH-Wert des Medium mit HCL auf 3 eingestellt wurde.

2.5.4 Tropfentest-Experimente

Für jedes Konstrukt wurden zwei bis vier Kolonien einer Transformation in 2 ml SC-Selektionsmedium über Nacht bei 30 °C bis zur frühstationären Phase ($OD_{600} \approx 1$) kultiviert. Im Fall großer Unterschiede in der optischen Dichte zwischen den Konstrukten wurde zur Synchronisation des Wachstums eine weitere Übernachtskultur auf eine optische Dichte von $OD_{600} \approx 0,1$ mit diesen Kulturen angeimpft. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (1000 × g, 5 min) geerntet, einmal mit 4 ml H₂O gewaschen und nach dem Zentrifugieren in 2 ml H₂O + 0,2 % (V/V) Tween 20 aufgenommen. Durch Verdünnen mit H₂O + 0,2 % (V/V) Tween 20 wurde von jeder Kultur in 2 ml Reaktionsgefäßen eine Hefezellsuspension mit einer optische Dichte von $OD_{600} = 0,5 \pm 0,008$ eingestellt. Hiermit wurde eine serielle Verdünnung von $OD_{600} = 0,5, 0,05, 0,005$ und $0,0005$ hergestellt. Sollte das Wachstum der Hefen unter verschiedenen definierten Metallkonzentrationen getestet werden, wurde Agarosemedium (1,5 % (m/V) Seakem-Agarose) verwendet, das wenig Phosphat und Sulfat enthält (*Low Sulphate/Phosphate Medium* (LSP), modifiziert nach Conklin *et al.*, 1992). Dieses Medium enthält 80 mM NH₄Cl, 0,5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 2 mM NaCl, 10 mM KCl, Spurenelemente (1,4 µM ZnSO₄, 2,5 µM MnSO₄, 8 µM H₃BO₃, 0,1 µM CuSO₄, 0,6 µM KI, 1,8 µM FeSO₄, 0,7 µM NH₄MO₄), Vitamine (0,08 µM Biotin, 16,78 µM des Hemi-Calciumsalzes von D-Pantothensäure, 32,5 µM Nicotinsäure, 19,5 µM Pyridoxin HCl, 11,8 µM Thiamin, 111 µM Inositol) und 2 % (m/V) D-Glucose. Zur Selektion von Transformanten enthielt dieses Medium alle in Abschnitt 2.5.2 aufgelisteten Aminosäuren mit Ausnahme der Aminosäuren (bzw. Uracil), welche die Transformanten aufgrund des Auxotrophiemarker der Plasmide synthetisieren können. Die hergestellten Wachstumspalten wurden ergänzt mit verschiedenen Metallkonzentrationen aus sterilen Stammlösungen von ZnSO₄ (0,1 M), CoCl₂ (0,1 M), MnCl₂ (1 M), CdSO₄ (1 M), NiSO₄ (1 M), FeSO₄ (0,1 M)¹⁷ oder

¹⁷Vor jeder Verwendung frisch hergestellt und mit 10 µM Na-Ascorbat ergänzt, um Oxidation zu Fe(OH)SO₄ mit einhergehender Präzipitation zu verhindern.

MnCl₂ (1 M). Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.5.5 Screen mit dem *Split Ubiquitin System*

Die Entwicklung der in **Abbildung 3.7** aufgelisteten Methodik zum Screen der zwei cDNA-Bibliotheken mit dem SUS ist in **Abschnitt 3.2** beschrieben.

2.6 Analyse transgener Pflanzen

2.6.1 Pflanzenmaterial und Transformation

Transgene Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynhold (Ökotyp Columbia, Col-0) wurden mittels *Agrobacterium* vermittelter Transformation durch *Floral-dip*-Infiltration erzeugt (Clough und Bent, 1998). Der Stamm *Agrobacterium tumefaciens*-GV3201 (enthält Hilfsplasmid pMP90) wurde mittels Elektroporation mit den zur Expression in der Pflanze bestimmten binären Vektoren transformiert.

2.6.2 Oberflächen-Sterilisation von Samen

Die Sterilisation erfolgte durch Inkubation für 1 min in 100 % Ethanol + 0,1 % (V/V) Tween 20, gefolgt von 5 min Inkubation in 70 % Ethanol + 0,1 % (V/V) Tween 20. Im Fall von stark kontaminierten Samen der T₁-Generation folgte hierauf eine zusätzliche Inkubation für 15 min in Bleichlösung (3 % (m/V) NaOCl, 0,1 % (V/V) Tween 20). Anderenfalls folgte direkt ein Waschschrift mit sterilem deionisiertem H₂O + 0,1 % (V/V) Tween 20, gefolgt von zwei weiteren Waschschriften in H₂O ohne Tween 20. Für die Selektion von Samen der T₁-Generation wurden die Samen über Nacht auf sterilem Filterpapier getrocknet und dann auf Wachstumsplatten verteilt. Für Segregationsanalysen in der T₂- und T₃-Generation wurden die Samen in Tropfen mit einer 1 ml Pipette auf den Platten verteilt. Sollten Linien verglichen werden (Wurzelwachstum, Enzymaktivitäten, Transkriptmengen), wurden die Samen einzeln auf den Platten mit einer Microtiter-Pipette (Ultipipette, Agar, Germany) verteilt. Nach den auftretenden Problemen Zn-Defizienz zu erzeugen (**Abschnitt 4.2.2** und **4.2.6**), wurde für Zn-Defizienz-Experimente beim ersten Waschschrift zusätzlich 10 µM EDTA zugegeben.

2.6.3 Wachstumsbedingungen

Auf Erde *A. thaliana*-Pflanzen wuchsen auf einem 1:1 (V/V)-Mix aus Standarderde (GS90) und Vermiculit in einem Gewächshaus (16 h Licht bei 250 µE, Tag/Nacht: 20 °C/18 °C, 50 %/80 % relative Luftfeuchtigkeit).

Auf Platten Sterilisierte Samen wurden auf *Arabidopsis*-Medium mit einem pH-Wert von 5,7 ausgesät, das ½-konzentriertem *Murashige Skoog* (MS)-Medium (Murashige und Skoog, 1962) ohne Zucker entspricht, dem 0,7 % (m/V) Select-Agar (Invitrogen) zugegeben wurden. Insofern nicht anders angegeben, wurden dem Medium 0,5 % (m/V) Saccharose zugefügt. Zur Selektion transgener Pflanzen wurden je nach Selektionsmarker folgende Verbindungen eingesetzt: Kanamycin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, DL-Phosphinotricin (Duchefa, Haarlem, Holland) $25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (jeweils unter Verwendung von 1000×konzentrierten Stammlösungen). Zur Kontrolle wurden Samen des Wildtyps derselben Selektion unterzogen.

Um kontrollierte Bedingungen für Metallionen-Behandlungen zu erzielen, wurde ¼-konzentriertes *Hoagland* (HOAG)-Medium benutzt (Hoagland und Arnon, 1938; Becher *et al.*, 2004). Zur Minimierung unerwünschter Metallkontaminationen wurde 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose oder 0,8 % (m/V) Sigma-Typ-A-Agar eingesetzt, anderenfalls 0,8 % (m/V) Sigma-Typ-M-Agar. Dieses Minimalmedium enthält $0,28 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $1,25 \text{ mM KNO}_3$, $1,5 \text{ mM Ca}(\text{NO}_3)_2$, $0,75 \text{ mM MgSO}_4$, $5 \text{ } \mu\text{M Fe-HBED}$, $5 \text{ } \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $5 \text{ } \mu\text{M MnSO}_4$, $1 \text{ } \mu\text{M ZnSO}_4$, $0,5 \text{ } \mu\text{M CuSO}_4$, $50 \text{ } \mu\text{M KCl}$, $5 \text{ } \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$ und $3 \text{ mM MES pH } 5,7$ (KOH). Der pH-Wert wurde direkt vor dem Autoklavieren eingestellt. Für Metallbehandlungen wurde das entsprechende Metall bei der Zubereitung weggelassen und aus konzentrierten Stammlösungen je nach gewünschter Konzentration bei der Herstellung der Wachstumsplatten zugegeben. Im Fall von Zn-Defizienz wurde Zn während der Zubereitung zunächst lediglich weggelassen. Nach dem Auftreten von Problemen Zn-Defizienz zu erzeugen, wurden alle Stammlösungen unter Verwendung reiner Chemikalien in Schott-Flaschen (Schott, Deutschland) neu angesetzt, die einmal mit 100 mM HCl sowie zweimal mit $18 \text{ M } \Omega \text{ H}_2\text{O}$ gespült wurden. Die zugegebene Agarose wurde dreimal mit $200 \text{ ml } 50 \text{ mM EDTA}$ gewaschen, gefolgt von acht Waschschritten mit $400 \text{ ml } 18 \text{ M } \Omega \text{ H}_2\text{O}$. Der Verlust von einem Drittel der Agarose während des Waschens wurde kompensiert, indem entsprechend mehr Agarose verwendet wurde. Die Wachstumsplatten aus Polyethylen wurden vor der Verwendung mit $20 \text{ ml } 10 \text{ mM EDTA}$ gewaschen, gefolgt von zwei Waschschritten mit $20 \text{ ml } 18 \text{ M } \Omega \text{ H}_2\text{O}$. Diese Maßnahmen waren ausreichend, um die Zn-Kontamination in frisch zubereiten Medien auf nicht detektierbare Werte zu senken (Tabelle 4.2). Allerdings wurde bei diesem zunächst Zn-freien Medium Zn-Kontamination festgestellt, nachdem es sich drei Wochen lang in den Polyethylen-Wachstumsplatten befand. Es wurde ebenfalls versucht, durch Zugabe von HEDTA selektiv die Konzentration von freiem Zn zu reduzieren. Die Ionenkonzentrationen des HOAG-Mediums wurden hierzu mit dem Programm GEOCHEMPC modelliert: Da HEDTA auch Fe^{3+} , Mn^{2+} und Cu^{2+} komplexiert, wurde dies durch Zugabe von Fe-HBED kompensiert. Bei Zugabe von $15 \text{ } \mu\text{M HEDTA}$ und $15 \text{ } \mu\text{M Fe-HBED}$, sinkt der Gehalt des kontaminierenden, freien Zn^{2+} von max. 300 nM auf $0,1 \text{ nM}$. Allerdings sinkt auch freies Cu^{2+} von $0,45 \text{ } \mu\text{M}$ auf $0,3 \text{ pM}$, freies Mn^{2+} von $0,47 \text{ } \mu\text{M}$ auf $0,2 \text{ } \mu\text{M}$ und freies Fe^{2+} von $0,43 \text{ fM}$ auf $0,28 \text{ fM}$ im Vergleich zu unbehandeltem Medium.

Nach der Aussaat wurden die Platten mit Leucopor-Band (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) ab-

gedichtet und zum Stratifizieren horizontal bei 4 °C für drei Tage gelagert. Die Platten wurden dann in einer Kammer mit kontrolliertem Klima (16 h Licht bei 120 µE, Tag/Nacht: 20 °C/18 °C, 60 %/75 % relative Luftfeuchtigkeit; Percival, CLF Laborgeräte GmbH, Emersaker, Deutschland) vertikal platziert. Antibiotikaselektion (siehe oben) wurde nur für Segregationsanalysen durchgeführt (zehn Tage) oder im Fall der Konfokalmikroskopie mit Pflanzen der T₁-Generation. Alle anderen Experimente wurden mit homozygoten Linien ohne Antibiotikaselektion durchgeführt. Im Fall der Konfokalmikroskopie mit Pflanzen der T₂-Generation, wurde die 3:1-Segregation des Antibiotikamarkers zunächst überprüft. Für die Mikroskopie wurden Pflanzen auf HOAG-Medium *ohne* Antibiotika angezogen, da *mit* Antibiotika bei Experimenten ohne Zn-Zugabe keine Keimung auf HOAG-Medium erfolgte.

Wachstumsbedingungen im hydroponischen System Je zwei sterilisierte Samen wurden in kleine schwarze Reaktionsgefäße (ca. 0,7 ml) gegeben, die 1/8-konzentriertes HOAG-Medium und 0,8 % Noble-Agar (BIO 101, Vista, USA) enthielten. Zum Stratifizieren/Vernalisieren wurden die Reaktionsgefäße bei 4 °C für drei Tage gelagert. Nach dem Abtrennen der Gefäßböden wurden je 20 Reaktionsgefäße schwimmend in jeweils eine Kiste mit 4 l 1/8-konzentriertem HOAG-Medium in eine Kammer mit kontrolliertem Klima (siehe oben) gestellt. Nach fünf Tagen wurde das Medium durch 1/4-konzentriertes HOAG-Medium ersetzt. Das Medium wurde daraufhin wöchentlich ersetzt, wobei beim zweiten Mediumswechsel je drei Pflanzen in jeweils eine Kiste mit 0,5 l Volumen gebracht wurden. Für Zn-Defizienz-Versuche wurde dem HOAG-Medium, 4 1/2 Wochen nachdem die Pflanzen in die Klimakammer gestellt wurden, kein Zn mehr zugegeben.

2.6.4 Charakterisierung von homozygoten transgenen Linien

Rund 1 000 Samen der T₁-Generation wurden gleichmäßig auf einer quadratischen Platte (12 cm Kantenlänge) verteilt, die *Arabidopsis*-Selektionsmedium (Abschnitt 2.6.3) enthielt. Nach zwei Wochen Wachstum in einer Kammer mit kontrolliertem Klima (s. oben) wurden 20 tolerante Pflanzen zur Produktion von Samen der T₂-Generation auf Erde umgesetzt. Rund 100 T₂-Samen von jeder T₁-Pflanze wurden wie beschrieben selektiert und die Anzahl der toleranten und sensitiven Keimlinge bestimmt. Anhand des Verhältnisses zwischen toleranten:sensitiven Keimlingen wurde gemäß den Mendelschen Regeln abgeschätzt, ob eine T-DNA-Insertion an einem einzigen genetischen Locus (Verhältnis von 3:1 = 0,75) in den transgenen Linien vorliegt. Linien, die dieses Verhältnis ±0,05 aufwiesen (jeweils rund 10 der 20), wurden in die T₃-Generation propagiert. In der T₃-Generation wurde die Selektion analog zur T₂-Generation durchgeführt, um homozygote Linien zu identifizieren, die ein Verhältnis von 1:0 zeigten.

2.6.5 Bestimmung der Elementgehalte in Pflanzen mittels ICP OES

Für die Analyse der Elementgehalte in Kapitel 4 wurde das Pflanzengewebe geerntet, drei Tage bei 60 °C getrocknet und die getrocknete Biomasse bestimmt. Zwischen 15 und 200 mg homogenisiertes Material wurden mit 65%iger Salpetersäure in einem mikrowellenbasierten Reaktionsbeschleuniger (MARS 5) aufgeschlossen und die Elementgehalte mittels ICP OES bestimmt.

2.6.6 Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskopie wurde mit 10–14 Tage alten Keimlingen von vier bis acht unabhängigen transgenen *A. thaliana*-Linien durchgeführt, die mit Konstrukten transformiert wurden, welche translationale Fusionen von *AtMTP2* mit EGFP kodieren. Die Expression der N- oder C-terminalen Fusionen stand hierbei entweder unter der Kontrolle des nativen *pMTP2*- oder des CaMV-*p35S*-Promotors. Für Analysen in der T₁-Generation, wurden Pflanzen auf HOAG-Agarosemedium angezogen, dem zur Selektion transgener Pflanzen Kanamycin zugegeben wurde (Abschnitt 2.6.3). Sobald transgene Keimlinge von nicht-transgenen unterschieden werden konnten (3 Tage nach Aussaat), wurden die transgenen Keimlinge auf HOAG-Agarosemedium *ohne* Antibiotika transferiert. Für Analysen in der T₂-Generation erfolgte keine Selektion mit Antibiotika (s. oben, S. 39). Andere Anzuchtbedingungen werden in Abschnitt 4.2.4 beschrieben. Gegenfärbungen für die Konfokalmikroskopie von Wurzeln wurden z. T. mit DAPI (1 µg · ml⁻¹, Zellkerne) und Propidiumjodid (50 µg · ml⁻¹, Zellwände und -kerne) durchgeführt, indem die Wurzeln für mind. 20 min in den Farbstoffen inkubiert wurden (beide Farbstoffe von Molecular Probes, jetzt Invitrogen). Propidiumjodid färbt bei niedrigen Konzentrationen (≈ 1 µg · ml⁻¹) neben Zellwänden nur Zellkerne von geschädigten und toten Zellen, ist bei hohen Konzentrationen aber in der Lage die Zellmembran zu durchdringen. Die Fluoreszenz wurde visualisiert mit einem *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) (Leica TCS SP2, Leica Microsystem, Wetzlar, Germany), wobei die folgenden Einstellungen verwendet wurden: EGFP 488/500–515 nm (Anregung/Detektion), DAPI 358/450–490 nm, Propidiumjodid 543/555–650 nm. Bei der Aufnahme von digitalen Bildern wurde die Fluoreszenz von EGFP und Propidiumjodid gleichzeitig detektiert, wobei als Strahlteiler ein doppelter *Dicroic*-Spiegel (max. Durchlässigkeit bei 488/543 nm) eingesetzt wurde. DAPI-Fluoreszenz wurde separat detektiert, wobei als Strahlteiler der Filter »Substrat« eingesetzt wurde. Die gemeinsame Aufnahme der Fluoreszenz von DAPI und EGFP/Propidiumjodid wurde durch ein sequenzielles Programm der Leica-Software gesteuert.

2.6.7 Analyse der β-Glucuronidase-Aktivität durch histochemische Färbung

Pflanzenmaterial wurde geerntet und in eiskaltes, 90%iges (V/V) Aceton transferiert. Nach Abschluss der Ernte wurde das Gewebe durch Inkubation bei 20–25 °C für 20 min fixiert. Das Gewebe wurde

in Färbepuffer (0,2 % (V/V) Triton X-100, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,2, 2 mM K₃Fe(CN)₆, 2 mM K₄Fe(CN)₆) gewaschen und daraufhin in Färbepuffer + 2 mM X-Gluc (Duchefa) transferiert. Die Proben wurden für 20 min einem milden Vakuum ausgesetzt und durch langsames Aufheben dieses Vakuums infiltriert. Exprimierten die Pflanzen GUS unter Kontrolle des *pMTP1*- oder *pMTP3*-Promotors, erfolgte die Färbung durch Inkubation für 2 h bei 37 °C. Im Fall von *pMTP2::GUS*-Linien erfolgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht. Nach der Inkubation in 30 % Ethanol für 1 h wurden die gefärbten Proben fixiert durch Inkubation in Fixierlösung (50 % (V/V) Ethanol, 5 % (V/V) Formaldehyd, 10 % (V/V) Essigsäure) für 30 min. Verbliebenes Chlorophyll wurde durch sequenzielle Inkubation in 70 % und 90 % (V/V) Ethanol entfernt. Nach der mikroskopischen Analyse wurden die Proben für den weiteren Gebrauch bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.6.8 Fluorimetrische GUS-Bestimmung

Fluorimetrische GUS-Bestimmung wurde mit einigen Modifizierungen wie von Jefferson *et al.* (1987) beschrieben durchgeführt. Wurzelmaterial wurde geerntet und nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) bei -80 °C gelagert. Für die Proteinextraktion wurde das Wurzelmaterial mit Seesand in 250 µl Extraktionspuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,4, 10 mM S-Mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0,1 % (m/V) SDS und 0,1 % (V/V) Triton X-100) gemörsert. Die Proben wurden zentrifugiert (22000 × g, 15 min, 4 °C) und 10 µl vom Überstand mit 140 µl GUS-Inkubationspuffer (1 mM 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronid (MUG) in Extraktionspuffer) vermischt. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 150 µl 200 mM Na₂CO₃ abgestoppt. Die Fluoreszenz des gebildeten 7-Hydroxy-4-Methylcoumarin (MU) wurde mit einem Fluorimeter bestimmt (Anregung/Emission 340 nm/460 nm). Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erfolgte mit BIO-RAD PROTEIN ASSAY der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben unter Benutzung einer BSA-Eichgerade. Die auf den Gesamt-Proteingehalt bezogene spezifische Aktivität wurde in der internationalen Einheit U¹⁸ pro mg Protein angegeben.

2.7 Transformation von *A. thaliana*-Protoplasten

Protoplasten von *A. thaliana*-Col-0-Suspensionskultur-Zellen (Sébastien Thomine¹⁹) wurden wie in Dräger *et al.* (2004) beschrieben präpariert. Mit der ebenfalls in Dräger *et al.* beschriebenen Methode wurden die Protoplasten transformiert mit *AtMTP2* in den Vektoren pK7FWG2 und pA7-p35S-N-GFP zur Expression der chimären Fusion von EGFP bzw. RSsmGFP an den C- bzw. N-Terminus von *AtMTP2* (Abschnitt 2.3). Zwei Tage nach der Transformation wurden die Protoplasten mittels Kon-

¹⁸IUPAC, 1U = 1 µmol MU · min⁻¹

¹⁹CNRS, Gif-sur-Yvette, Frankreich

fokalmikroskopie (Abschnitt 2.6.6) untersucht.

2.8 Kopplung der ETV mit der ICP OES

Die Proben wurden in Graphittiegel am *Autosampler* AWD-10 (Spectral Systems) eingewogen, der über die serielle Schnittstelle (EIA- bzw. RS-232) mit einem Computer verbunden ist. Die Aufzeichnung der Probeneinwaagen geschah mit einem Terminal-Programm (TERRATERM), nachdem am *Autosampler* die Einwaage unter Verwendung eines 50-fach Probenellers mit »*WeighUpd.*« gestartet wurde. Die aufgezeichneten Einwaagen wurden in einer Datei mit der Dateinamenserweiterung »*.rwe« oder »*.swe« (*Reference Weight/Sample Weight*) gespeichert. Zur elektrothermalen Verdampfung von Pflanzenproben wurde die ETV4000 (Spectral Systems) mit folgenden Parametern betrieben: 200 ml · min⁻¹ äußerer Argonfluss, 300 ml · min⁻¹ innerer Argonfluss, dem 2 ml · min⁻¹ Freon22 (Chlordifluormethan) beigemischt wurden, *Stand Alone*-Betriebsmodus. Es wurde das folgende Heizprogramm verwendet (Abschnitt 5.2.2): 0–1 s bei 20 °C, 1–21 s bei 300 °C, 22–32 s bei 750 °C, 33–50 s bei 2500 °C, 51–161 s bei 20 °C. Die Temperaturen sind die programmierten Vorgaben, der das System bei Temperaturanstiegen mit leichter Verzögerung ($\approx 300 \text{ °C} \cdot \text{s}^{-1}$) und bei der Abkühlung mit starker Verzögerung ($\approx 23 \text{ °C} \cdot \text{s}^{-1}$) folgt. Die Kühlung des Systems erfolgt über einen zirkulierenden Wasserkreislauf mit der Wasserkühlung KWL-40 von Spectral Systems. Die ETV4000 wurde an die ICP OES IRIS INTREPID HR DUO (Thermo Elemental) gekoppelt. Die Überleitung des Probenaaerosols ins Plasma erfolgte mit einem Teflon®-Schlauch von 30 cm Länge, der leicht gebogen verlegt wurde.²⁰ Für die Analyse wurde eine Methode in der Steuerungssoftware (TEVA v1.6) des an die ICP OES gekoppelten Computers mit folgenden Parametern entwickelt: Lichtquelle: »ICAP«, Probenzufuhr: »*Ion Chromatograph*«, Auslöser: »*Door Switch*«. Die Wellenlängen und Brechungsordnungen der analysierten Elemente sind in Tabelle 5.1 aufgelistet. Die Software wurde in den Modus »*Continuous Run*« versetzt und die Probenzufuhr in den Graphitrohr-Ofen am *Autosampler* mit der Funktion »*LBatch*« gestartet. Nach der Analyse wurde mit dem TEVA REPORT MANAGER ein *Horizontal Table Report* generiert und als EXCEL-Tabelle (Version 8, »*Data only*«) exportiert. Die EXCEL-Datei wurde entsprechend der Datei benannt, welche die dazugehörigen Einwaagen enthält (Dateinamenserweiterung *.r.xls oder *.s.xls (*Reference/Sample*)). Die Auswertung erfolgte mit der in Abschnitt 5.3 vorgestellten Erweiterung für ORIGIN. Die Erweiterung ist in die PDF-Datei dieser Arbeit eingebettet und kann durch Klicken auf das Symbol auf Seite 101 gespeichert oder installiert werden.

²⁰Hiermit wird vermieden, dass Licht vom glühenden Graphitrohr auf den Detektorchip der ICP OES fällt, was insbesondere die Detektion von Na und K beeinträchtigt.

3 Resultate Teil A: Interaktionsscreen für Mitglieder der *Cation Diffusion Facilitator*-Familie

3.1 Vorexperimente zur Etablierung des *Split Ubiquitin System* für Screens

Vor dem *Screening* von zwei Bibliotheken auf Interaktoren von MTPs wurde überprüft, ob die verwendeten *A. thaliana*-cDNA-Bibliotheken die als *Bait* benutzten Proteine beinhalten. Die Präsenz ist nicht unbedingt erforderlich, aber es ist davon auszugehen, dass spezifische Interaktoren für ein Protein nur dann in einem Gewebe oder Organ exprimiert werden, wenn das Protein selbst auch exprimiert wird. Die Wahrscheinlichkeit der Identifikation von Interaktoren ist daher in so einem Falle höher. Eine der beiden verwendeten *A. thaliana*-Bibliotheken wurde von Laurent Deslandes erhalten (LD-Bibliothek, s. S. 28) und enthielt cDNAs aus Blüten. Die zweite verwendete Bibliothek von Filippa Santos (FS-Bibliothek, s. S. 27) enthielt gepoolte cDNAs aus Suspensionskultur-Zellen, grünen Pflanzenteilen von Gewächshauspflanzen und Wurzeln von Hydrokulturlpflanzen. In **Abbildung 3.1** ist wiedergegeben, dass die LD-Bibliothek tatsächlich die cDNAs aller für den Screen verwendeten *MTPs* enthält, wohingegen *AtMTP2* in der FS-Bibliothek nicht enthalten ist.

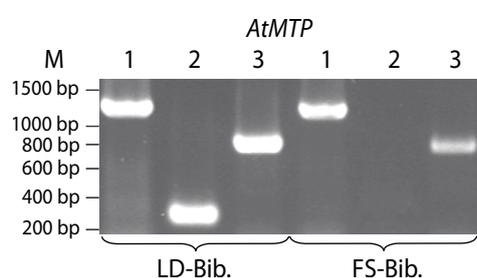


Abb. 3.1: Präsenz von *AtMTP1*, *AtMTP2* und *AtMTP3* in den Split Ubiquitin-Bibliotheken. PCRs mit spezifischen Primern wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die cDNAs der im Screen eingesetzten *Bait*-Proteine in den Bibliotheken enthalten sind. Falls vorhanden, wurde für *AtMTP1* ein 1194 bp Produkt erwartet (5'-ATGGAGTCTTCAAGTCC-CACC-3'/5'-GCGCTCGATTTGTATCGTGACATG-3'), für *AtMTP2* 283 bp (5'-AGGACAACCATTAAGATGC-3'/5'-ACGCTCGATTTGTATCGTAACGTGA-3') und für *AtMTP3* 813 bp (5'-ATGAAAGACCATATTCATGAGCATG-3'/5'-AGGATCTTCCAC-TCCGGCTTA-3').

Die Überprüfung der funktionalen Expression der *Bait*-Fusionsproteine in Hefe (*S. cerevisiae*) ermöglicht es mehrere Fragen zu beantworten. Zum einen ist die Expression der Fusionsproteine in Hefe essenziell für die Identifikation putativer Interaktionen mit dem SUS. Zum anderen kann damit getestet werden, ob die Topologie der als *Bait* eingesetzten Membranproteine im heterologen Hefesystem

weitestgehend korrekt ist. Nur in diesem Falle wäre das Fusionsprotein funktional und die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die für eine putative Interaktion benötigte Domäne für einen Interaktor vorhanden und prinzipiell zugänglich ist. Allerdings kann die Zugänglichkeit solcher Domänen nicht direkt getestet werden. Sie könnte z.B. durch das fusionierte C_{Ub} verdeckt sein. Putative Interaktoren könnten ebenso wie die *Baits* Membranproteine sein. Für den positiven Nachweis der funktionalen Expression der Fusion eines Membranprotein mit N_{Ub} als Beispiel für einen *Prey* gelten daher analoge Überlegungen wie für die *Bait*-Fusionsproteine. Von *AtMTP1* und -3 ist bekannt, dass sie *in planta* und heterolog exprimiert in Hefe in der Vakuolenmembran lokalisiert sind und die Zn-Hypersensitivität der *zrc1* bzw. der *zrc1 cot1* Mutante von *S. cerevisiae* komplementieren (Arrivault *et al.*, 2006; Dräger *et al.*, 2004). **Abbildung 3.2** zeigt, dass die MTPs in Fusion mit C_{Ub} – mit Ausnahme von *AtMTP1* – der *zrc1 cot1* Mutante erhöhte Zn-Toleranz verleihen und somit funktional sind. Bei dem entsprechen-

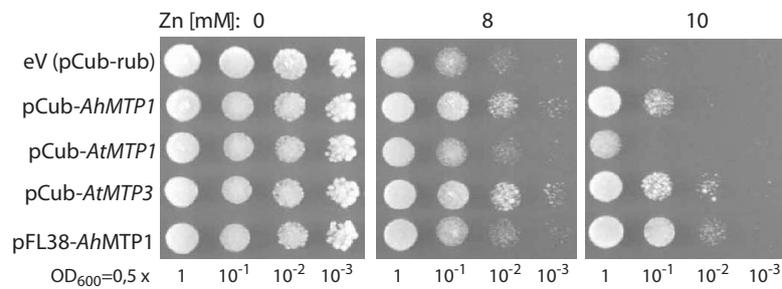


Abb. 3.2: Funktion der MTPs als C_{Ub} -Fusionsproteine. *AhMTP1*, *AtMTP1* und *AtMTP3* wurden in den *Bait*-Vektor Gateway®-kloniert und die Zn-hypersensitive *Knockout*-Mutante *zrc1* damit transformiert. Als negative bzw. positive Kontrolle für den Komplementationstest dienten der pM-Cub-Leervektor bzw. *AhMTP1* im Expressionsvektor pFL38GW-H. Übernachtskulturen wurden mit Wasser gewaschen und Verdünnungsstufen von $OD_{600} = 0,5, 0,05, 0,005$ und $0,0005$ hergestellt. Davon wurden je $10 \mu\text{l}$ Tropfen auf SC –HIS –MET-Platten pipettiert, welche $0, 8$ und 10 mM ZnSO_4 enthielten. Die Expression der *Bait*-Fusionsproteine steht unter Kontrolle des Methionin-reprimierten Promotors *pMET25*.

den Test der N_{Ub} -Fusionsproteine wurde gleichzeitig die optimale Cu-Konzentration zur Induktion der *pCUP1*-Promotor kontrollierten Expression der *Prey*-Proteine der Bibliotheken bestimmt (**Abbildung 3.3**). Beim Einsatz des SUS wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass genug kontaminierendes Cu im Medium vorhanden ist.¹ Um dies zu überprüfen, wurde der Cu-Gehalt des verwendeten Mediums mittels ICP OES ermittelt. Die Cu-Konzentration betrug nur $\approx 0,33 \mu\text{M}$. Dieses Ergebnis und die in **Abbildung 3.3** dargestellte Beobachtung, dass bei Zugabe von $30 \mu\text{M}$ Cu die Komplementation von *zrc1* durch *MTP1* am stärksten ausgeprägt ist, lässt darauf schließen, dass die Zugabe von Cu für den Screen erforderlich ist. Es ist vorstellbar, dass es bei starker Überexpression der *Prey*-Proteine zur Interaktion mit dem *Bait* lediglich aufgrund räumlicher Limitierungen in der Zelle kommen könnte. Bei dem in **Tabelle 3.1** (S. 48) mit T2 bezeichneten Screen wurde daher getestet, ob steigende Cu-Konzentrationen zu einer steigenden Anzahl an (falsch positiven) Kandidaten führt. Da dies nicht der Fall war,

¹L. Deslandes, persönliche Kommunikation

wurden bei allen folgenden Screens 30 μM Cu zugegeben, um die Expression der von der Bibliothek kodierten *Prey*-Proteine zu gewährleisten.

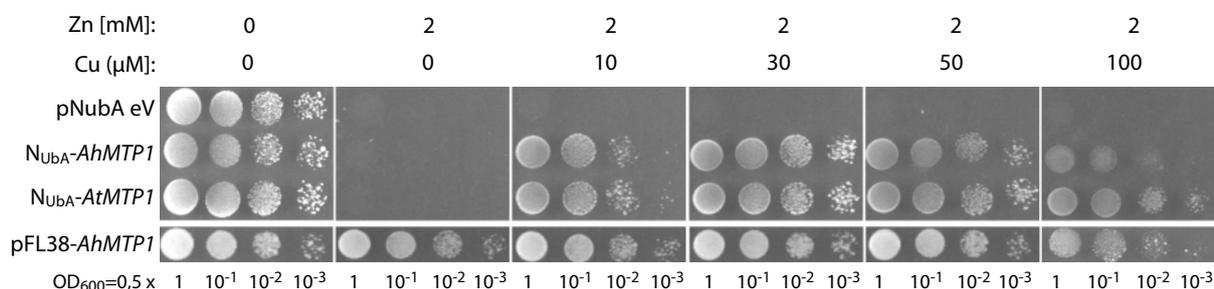
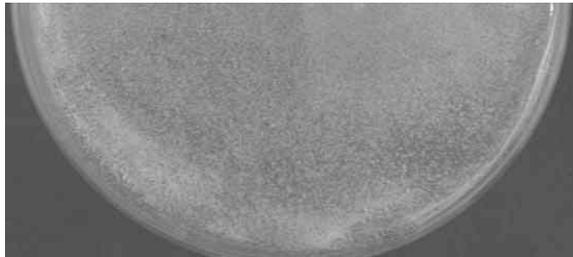


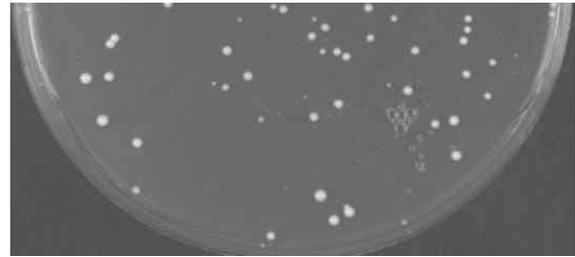
Abb. 3.3: Funktion der MTPs als N_{UbA}-Fusionsproteine und Cu-Abhängigkeit der Komplementation. *AhMTP1* und *AtMTP1* wurden in den *Prey*-Vektor Gateway®-kloniert und die Zn-hypersensitive Doppel-Knockout-Mutante *zrc1 cot1* damit transformiert. Im *Prey*-Vektor (pNubI/A/V/G) ist die Expression der klonierten cDNA unter der Kontrolle des Cu-induzierten Metallothionein-Promotors *pCUP1*. Als negative bzw. positive Kontrolle für den Komplementationstest dienten der pNub-Leervektor bzw. *AhMTP1* im Expressionsvektor pFL38GW-H. Übernachtkulturen wurden mit Wasser gewaschen und Verdünnungsstufen von OD₆₀₀ = 0,5, 0,05, 0,005 und 0,0005 hergestellt. Davon wurden 10 μl Tropfen auf SC –LEU-Platten pipettiert. Diese enthielten entweder kein Zn oder die für *zrc1 cot1* toxische Konzentration von 2 mM Zn. Zur Induktion der Expression der *Prey*-Fusionsproteine wurden verschiedene Mengen Cu hinzugegeben. Für die positive Kontrolle pFL38GW-H-*AhCDF1* wurden SC –HIS-Platten benutzt.

Die prinzipielle Funktion des verwendeten SUS wurde mit *Bait*- und *Prey*-Proteinen getestet, für welche die Interaktion entweder schon nachgewiesen bzw. vermutet wurde. So wurde für *AtAKT1* Selbstinteraktion bereits mehrfach demonstriert (Daram *et al.*, 1997; Obrdlik *et al.*, 2004). Letztere benutzten dabei eine Variante des SUS, die dem hier verwendeten System ähnelt, aber aufgrund des verwendeten Reporters weniger stringent ist. So führt bei der hier verwendeten Variante des SUS die Interaktion eines *Bait*-Proteins mit einem *Prey* zum Abbau eines Ura3p-Reporters gemäß dem in **Abbildung 1.2** dargestellten Schema. Nur wenn dieser Reporter vollständig abgebaut ist und mithin keine Ura3p-Restaktivität verbleibt wird bei Wachstum auf 5-FOA-Selektionsmedium kein toxisches 5-Fluoruracil synthetisiert. Interaktion wird folglich durch Resistenz gegenüber 5-FOA angezeigt. Im Gegensatz dazu ist der verwendete Reporter beim von Obrdlik *et al.* verwendeten SUS ein Transkriptionsfaktor, der bei Abspaltung von C_{Ub} nicht abgebaut wird, sondern die Expression von His3 und *lacZ* initiiert. Auch teilweise Komplementation einer HIS-Auxotrophie des für den Screen verwendeten Hefestamms und geringe β -Galactosidase-Aktivität aufgrund geringer *lacZ*-Expression führt hier zu einem positiven Interaktionssignal. Die MTPs selber wurden als weitere putative positive Kontrollen eingesetzt. Für *PtdMTP1* wurde Selbstinteraktion mittels SDS-PAGE nachgewiesen (Blaudez *et al.*, 2003). Daher wurden auch für homologe MTPs aus *A. thaliana* Interaktionen aufgrund von homo- oder heteromeren Komplexen erwartet. Bei ersten in **Abbildung 3.4** dargestellten Interaktionstests im SUS wurden die *Bait-Prey*-Doppeltransformanten des Hefestamms JD53 auf Minimalmedium (SD) mit und ohne 5-FOA plattiert. Beobachtet wurde sowohl für die positiven als auch für die negativen Kontrollen das gleiche, unerwartete Ergebnis: Es wuchsen in allen Fällen auf den 5-FOA-Platten einige

wenige Hefekolonien. Für die positiven Kontrollen (Selbstinteraktion von MTPs bzw. von *AtAKT1*) wurde erwartet, dass auf den 5-FOA-haltigen Selektionsplatten ebenso viele Kolonien wachsen wie auf Platten ohne 5-FOA. Im Gegensatz dazu sollten bei den negativen Kontrollen (MTPs mit *AtAKT1*) auf 5-FOA-haltigen Selektionsplatten *keine* Kolonien wachsen. Zur Erklärung der Beobachtung wur-



pNub-*AtCDF1*+*AtAKT1*-pCub: Minimalmedium ohne 5-FOA



pNub-*AtCDF1*+*AtAKT1*-pCub: Minimalmedium mit 5-FOA

Abb. 3.4: Test des *Split Ubiquitin Systems* mit Interaktionskontrollen. Der Hefestamm JD53 wurde transformiert mit dem Vektor pNubAGW-L, der die cDNAs von *AhMTP1*, *AtMTP3* bzw. *AtAKT1* enthielt. Jede dieser Transformanten wurde daraufhin transformiert mit pM-Cub, der die cDNAs von *AhMTP1*, *AtMTP1*, *AtMTP3* bzw. *AtAKT1* enthielt. Nach gleichmäßiger Aufteilung der Doppeltransformanten auf Minimalmedium ohne und mit 5-FOA ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), sollte im Falle positiver Interaktion eine vergleichbare Anzahl Kolonien wachsen. Dies war bei keiner der zwölf Kombinationen der Fall, weshalb nur eine Kombination exemplarisch dargestellt ist. Die Expression der *Bait* Fusionsproteine steht unter Kontrolle des Methionin-reprimierten Promotors *pMET25*. Zur Expression der *Prey*-Fusionsproteine wurde $30 \mu\text{M}$ Cu zum Medium gegeben. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

den zwei Hypothesen aufgestellt: Entweder deutet das Wachstum auf den 5-FOA-haltigen Selektionsmedien darauf hin, dass alle Kontrollen positive Interaktion anzeigen. Dass hierbei auf den 5-FOA-haltigen Medien viel weniger Kolonien wachsen als auf den Platten ohne 5-FOA, könnte am niedrigen pH-Wert von 2,9 liegen, der nach 5-FOA-Zugabe erreicht wird. Unter Umständen überleben nur wenige Transformanten, wenn sie auf Medium mit diesem pH-Wert plattiert werden. Die zweite Hypothese war, dass alle Kontrollen negative Interaktion anzeigen. Das Wachstum einiger weniger Kolonien auf 5-FOA-haltigem Medium könnte in diesem Fall auf *Escapes* zurückgehen. Als *Escapes* werden dabei solche Hefen bezeichnet, die den Ura3p-Reporter nicht durch Interaktion und damit einhergehenden Reporterabbau verloren haben (vergl. **Abbildung 1.2**), sondern durch Umbau oder Mutationen des *Bait*-Vektors. Von einem System, das für einen Screen eingesetzt wird, sollte man im Falle nicht vorhandener Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* erwarten, dass unter einigen Millionen Doppeltransformanten keine oder nur sehr wenige Transformanten der Selektion entgehen und fälschlicherweise Interaktion anzeigen. Um den beiden Möglichkeiten auf den Grund zu gehen, wurde der in **Abbildung 3.5** dargestellte Tropfentest durchgeführt. Bei diesem Experiment wurden Doppeltransformanten erhalten, indem sie nach der Transformation zunächst auf Minimalmedium ohne 5-FOA plattiert wurden. Von einigen dort wachsenden Kolonien wurden Übernachtskulturen angeimpft, die für den darauf folgenden Tropfentest auf Selektionsplatten mit und ohne 5-FOA bei verschiedenen pH-Werten verwendet wurden. Es wurde erwartet, dass im Falle von Interaktion alle im Tropfen enthaltenen

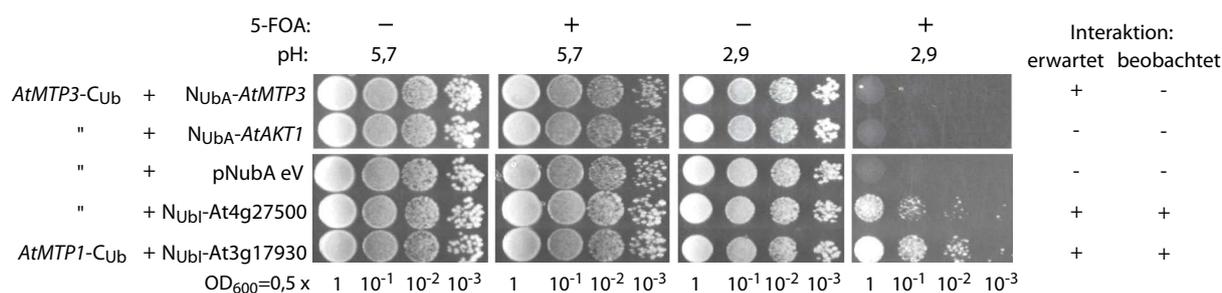


Abb. 3.5: Tropfentest mit positiven und negativen Kontrollen sowie einigen Interaktionskandidaten zum Test des *Split Ubiquitin Systems*. Von den in Abbildung 3.4 erwähnten Doppeltransformanten wurde für diesen Test eine *Prey/Bait*-Kombination mit erwarteter Interaktion ausgewählt, sowie zwei Kombinationen, bei denen dies nicht erwartet wurde. Zusätzlich wurden zwei durch Screening identifizierte Kandidaten (vergl. TABELLE 3.2, S. 51) getestet. Doppeltransformanten des Hefestamms JD53 wurden wie in ABBILDUNG 3.4 beschrieben erhalten und auf Minimalmedium ohne 5-FOA ausplattiert. Von je drei Kolonien pro *Prey/Bait*-Kombination wurden Übernachtskulturen angesetzt, diese mit Wasser gewaschen und Verdünnungsstufen von OD₆₀₀ = 0,5, 0,05, 0,005 und 0,0005 hergestellt. Davon wurden 10 µl Tropfen auf SC –HIS –MET –URA-Platten pipettiert. Die Platten unterschieden sich im pH-Wert (2,9 und 5,7) sowie im 5-FOA-Gehalt (ohne oder 1 mg · ml⁻¹). Zur Induktion der Expression der *Prey*-Proteine wurden 30 µM Cu zum Medium gegeben. Die Expression der *Bait*-Fusionsproteine steht unter Kontrolle des Methionin-reprimierten Promotors *pMET25*.

Zellen auf 5-FOA-Platten wachsen bzw. gar keine im Falle nicht stattfindender Interaktion. In der Abbildung sind bei der Kombination von *AtMTP3*-Cub und NubA-*AtMTP3* bei den zwei höchsten Zelldichten (pH 2,9 mit 5-FOA) zwei *Escapes* zu erkennen. Zwei zu diesem Zeitpunkt bereits durch Screening identifizierte putative Interaktoren wachsen dahingegen deutlich unterscheidbar auf dieser 5-FOA-Platte, woraus geschlossen wurde, dass das verwendete SUS zumindest prinzipiell funktional sein könnte. Weiterhin zeigt die Abbildung, dass 5-FOA nur bei niedrigen pH-Wert funktional ist, da bei pH 5,7 auf den 5-FOA-Platten alle Kombinationen wachsen. Aus der Literatur ist bekannt, dass nur die protonierte Form von 5-FOA von Zellen aufgenommen werden kann (maximale Wirksamkeit bei pH 2,8, ausreichend wirksam bei pH 4 und unwirksam bei pH > 6)². Der Unterschied zwischen *Escapes* und tatsächlichem Wachstum auf 5-FOA Selektionsplatten bei pH 2,9 ist in Abbildung 3.6 deutlich zu erkennen. Somit ist klar, dass alle Kolonien auf 5-FOA-Platten in Abbildung 3.4 auf *Es-*

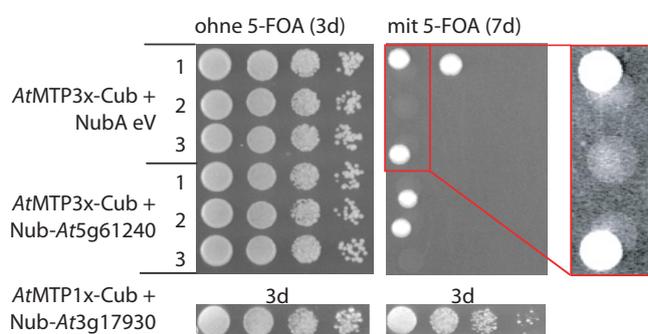


Abb. 3.6: Unterschied zwischen *Escapes* und tatsächlichem Wachstum auf 5-FOA-Selektionsplatten bei pH 2,9. Zur Durchführung des Experiments siehe Abbildung 3.5. In der vergrößerten Box erkennt man deutlich, dass nicht auf der gesamten Fläche des Tropfens Zellen gewachsen sind, sondern nur eine Kolonie, die auf einen *Escape* zurückgeht (siehe Text zur Erklärung).

capas zurückgehen. Aus dem in Abbildung 3.5 gezeigten Experiment, dass zwischen *Escapes* und echt-

²<http://www.duke.edu/web/microlabs/mccusker/Resources/MediaRecipes.pdf>

Positiven im SUS unterschieden werden kann, folgt, dass mit der hier verwendeten Version des SUS die erwarteten Interaktionen der Proteine *AtAKT1*, *AtMTP1* und *AtMTP3* mit sich selbst nicht bestätigt werden können. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die durch den *pCUP1*-Promotor kontrollierte sehr starke Überexpression des *Prey* bei Zugabe von 30 μM Cu das gehäufte Auftreten falsch-positiv angezeigter Interaktionen bedingt, wurde kein Cu zugegeben. Auch in diesem Fall wurden *Escapes* in vergleichbarer Anzahl beobachtet (nicht dargestellt). Der Interaktionstest im SUS für alle in **Abbildung 3.4** erwähnten Kombinationen zwischen *AtAKT1* und MTPs wurde mit dem besser geeigneten Tropfentest (**Abbildung 3.5**) mit dem gleichen negativen Ergebnis nochmals durchgeführt (nicht dargestellt).

3.2 Interaktionsscreen mit dem *Split Ubiquitin System* in Hefe

Beim Screening von zwei cDNA-Bibliotheken wurden als *Baits* *AbMTP1*, *AtMTP1*, *AtMTP2* und *AtMTP3* eingesetzt. Eine Übersicht über alle durchgeführten Screens ist in **Tabelle 3.1** gegeben. Bei

Tab. 3.1: Übersicht über alle mit dem SUS durchgeführten Screens zweier Bibliotheken (LD- und FS-Bibliothek, s. ABSCHNITT 2.2) mit *AtMTP1*, *AbMTP1*, *AtMTP2* und *AtMTP3* als *Bait*. Die Unterschiede zwischen den Screens sind im Text beschrieben. Die im Zuge der Screens etablierte Methode ist in **ABBILDUNG 3.7** beschrieben. Für jeden *Bait* ist die Anzahl der gescreenten Klone sowie die Zahl der identifizierten und bestätigten Kandidaten (vergl. **TABELLE 3.2**) angegeben (jeweils 1., 2. und 3. Spalte unter jedem *Bait*). Die letzte Spalte kennzeichnet das Medium, auf das die Doppeltransformanten plattiert wurden. Der zweite Screen, bei dem vor der Selektion auf 5-FOA ein Amplifikationsschritt auf SC-Medium erfolgte, wurde in der Zusammenfassung (letzte Zeile) nicht berücksichtigt.

Screen	Bait				Plattiert auf
	<i>AtMTP1</i>	<i>AbMTP1</i>	<i>AtMTP2</i>	<i>AtMTP3</i>	
T1	— / — / —	$4 \cdot 10^4$ / 0 / 0	— / — / —	— / — / —	5-FOA, 0,3 μM Cu
1	$1 \cdot 10^6$ / >1000 / 0	— / — / —	— / — / —	$1 \cdot 10^6$ / >1000 / 0	SC, 5-FOA, 0,3 μM Cu
2	$8,1 \cdot 10^4$ / 1 / 0	$8,1 \cdot 10^4$ / 0 / 0	— / — / —	$8,1 \cdot 10^4$ / 1 / 0	5-FOA, 0,3 μM Cu
T2	$3 \cdot 10^4$ / 0 / 0	$2,2 \cdot 10^4$ / 0 / 0	— / — / —	$2,1 \cdot 10^4$ / 0 / 0	5-FOA, 0–100 μM Cu
3	— / — / —	— / — / —	— / — / —	$4,1 \cdot 10^5$ / 0 / 0	5-FOA, 30 μM Cu
4	$6,4 \cdot 10^5$ / 5 / 3	$6,4 \cdot 10^5$ / 3 / 2	— / — / —	$6,4 \cdot 10^5$ / 1 / 1	5-FOA, 30 μM Cu
5	$1,2 \cdot 10^5$ / 8 / 3	$4,7 \cdot 10^4$ / 0 / 0	— / — / —	$1,5 \cdot 10^5$ / 8 / 8	5-FOA, 30 μM Cu
6 (LD)	$2,4 \cdot 10^6$ / 8 / 0	$1,7 \cdot 10^6$ / 6 / 1	$2,4 \cdot 10^6$ / 8 / 1	$2,1 \cdot 10^6$ / 9 / 0	5-FOA, 30 μM Cu
6 (FS)	$2,7 \cdot 10^6$ / 21 / 2	$2,7 \cdot 10^6$ / 23 / 0	$2,7 \cdot 10^6$ / 0 / 0	$3,6 \cdot 10^6$ / 20 / 1	5-FOA, 30 μM Cu
Summe	$5,9 \cdot 10^6$ / 43 / 8	$5,2 \cdot 10^6$ / 32 / 2	$5,1 \cdot 10^6$ / 8 / 1	$7 \cdot 10^6$ / 39 / 10	

der Durchführung der Screens wurde ab dem in dieser Tabelle mit T2 bezeichneten Screen dem in **Abbildung 3.7** dargestellten Schema gefolgt. Bei der Etablierung dieses Schemas flossen verschiedene Vorexperimente und Erfahrungen bei ersten Screens ein. Anfangs wurde beim Screening kein Cu zum 5-FOA-Selektionsmedium gegeben (s. S. 44). Die in **Abschnitt 3.1** erörterten Vorexperimente zeigten, dass Zugabe von 30 μM Cu zum 5-FOA-Selektionsmedium notwendig ist. Da beim ersten (mit

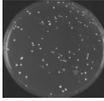
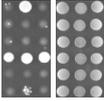
- 1) Transformation von JD53 mit dem *Bait*-Plasmid
- 2) Transformation mit einer cDNA Bibliothek (*Prey*-Plasmid)
- 3) Plattieren der Doppeltransformanten auf Platten mit 5-FOA 
- 4a) *Prey*-Plasmid Isolation und Amplifikation in *E.coli*
- 4b) Amplifikation der *Prey*-cDNA + beidseitig je 100 bp flankierender Vektorsequenz per PCR
- 5a) Retransformation von JD53 mit Kandidat-*Prey* und *Bait*
- 5b) Retransformation von JD53 mit *Bait*, linearisiertem *Prey*-Plasmid + PCR Produkt
- 6) Plattieren der Doppeltransformanten auf Platten ohne 5-FOA 
- 7) Resuspendierte Kolonien auf Platten mit 5-FOA tropfen 

Abb. 3.7: Übersicht über den Screen. Ergänzende Informationen zum dargestellten Schema: 1 Plattieren auf SC-HIS-Medium, 3 Plattieren auf SD + LEU + LYS + URA-Medium mit $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 5-FOA und $30 \mu\text{M}$ Cu, 4a, 5a nur möglich, wenn *Bait*- und *Prey*-Plasmid unterschiedliche bakterielle Marker haben (im Falle der LD-Bibliothek, s. S. 28), 4b, 5b *Gap Repair*-Methode, angewendet für die FS-Bibliothek (s. S. 27), 6 Plattieren auf SC-HIS-TRP-Medium. Alle somit bestätigten Kandidaten wurden sequenziert. Entweder wurden dafür die schon vorliegenden Plasmide aus Schritt 4a verwendet, oder das nachträglich gemäß diesem Schritt isolierte und amplifizierte *Bait/Prey*-Plasmidgemisch im Falle der Kandidaten, die über den Weg 4b/5b identifiziert wurden.

T1 bezeichneten) Screen mit *AbMTP1* als *Bait* keine Kandidaten identifiziert werden konnten, wurde angenommen, dass frisch transformierte Zellen durch möglicherweise zeitlich frühere Expression des *Bait*-Proteins und des fusionierten Ura3p-Reporters aufgrund dessen Aktivität (Synthese von toxischem 5-Fluoruracil) tot sind, bevor eine Interaktion stattfinden kann, die den Reporter abbaut. Um es den Zellen zu ermöglichen beide Fusionsproteine in ausreichendem Maße zu exprimieren, wurden die Doppeltransformanten beim zweiten Screen zunächst zwei Tage auf Medium ohne 5-FOA plattiert. Es zeigte sich jedoch, dass durch diesen Schritt lediglich eine starke Amplifikation von *Escapes* stattfand. Die Kandidaten des Screens 1 und 2 (Tabelle 3.1) wurden nicht durch den in **Abbildung 3.7** Schritt sechs und sieben umfassenden Tropfentest überprüft, sondern lediglich durch Re-plattieren auf 5-FOA-Selektionsmedium. Da aufgrund von *Escapes* in diesem Falle immer Wachstum auf 5-FOA-Selektionsplatten beobachtet wird, ist dieser Test für eine Überprüfung der Kandidaten nicht geeignet. Bei den Vorexperimenten stellte sich heraus, dass der in **Abbildung 3.5** beschriebene Tropfentest besser geeignet ist, um *Escapes* von tatsächlichem Wachstum auf 5-FOA-Selektionsplatten zu unterscheiden. Alle bis dahin identifizierten Kandidaten wurden daher gemäß dem in dieser **Abbildung** beschriebenen Tropfentest überprüft. Später wurde dieser Test etwas modifiziert, um einen höheren Durchsatz bei der Überprüfung von weiteren, in späteren Screens identifizierten Kandidaten zu erzielen. So wurden nicht für jede zu testende Doppelmutante eine Übernachtskultur angesetzt, um daraufhin serielle Verdünnungen herzustellen, sondern es wurden lediglich Kolonien gleicher Größe in jeweils $100 \mu\text{l}$ H_2O resuspendiert, um davon $10 \mu\text{l}$ auf Selektionsplatten zu tropfen. In Teil A der **Abbildung 3.8** sind exemplarische Ergebnisse dieses Tests dargestellt. Bei einigen Kandidaten wuchsen von bis zu sieben getesteten Kolonien auf 5-FOA-haltigem Medium nur einige wenige. Auch diese Kandidaten wurden

Kandidat	mit 5-FOA	ohne 5-FOA	Kandidat (AtMTP)	mit 5-FOA	ohne 5-FOA	Kandidat (AtMTP)	mit 5-FOA	ohne 5-FOA
At1g66270			At5g54940 (1)		0/2		At4g27500 (3)	10/10
unbekannt			At3g17930 (1)		2/2		At1g24520 (3)	2/2
unbekannt			At1g50020 (1)		2/2		At3g17440 (3)	2/2
At5g53560			At5g53560 (1)		14/14		At2g32720 (3)	2/2
unbekannt			At2g31800 (Ah1)		2/2		At5g37310 (3)	2/2
unbekannt			At3g45600 (3)		2/2		At4g27840 (3)	2/2
			At2g32580 (3)		2/2		At4g32530 (3)	2/2
A			B					

Abb. 3.8: Tropfentest zur Bestätigung der im Screen identifizierten Kandidaten im SUS. Doppeltransformanten (Kandidat-*Prey* + MTP-*Bait*) des Hefestamms JD53 wurden erhalten wie in **Abbildung 3.7** beschrieben und auf SC –HIS –TRP plattiert. Einzelne Kolonien wurden in 100 µl H₂O resuspendiert und davon 10 µl auf SD + LEU + LYS + URA-Medium mit und ohne 5-FOA getropft. Zur Induktion der Expression der *Prey*-Proteine wurden 30 µM Cu zum Medium gegeben. Die Expression der *Bait* Fusionsproteine steht unter Kontrolle des Methionin-reprimierten Promotors *pMET25*. **A** exemplarische Ergebnisse dieses Test (siehe Text), **B** Ergebnis des Tests für alle in TABELLE 3.2/3.3 aufgelistete Kandidaten, außer At2g47070, At2g47010 und At1g04410.

sequenziert, wobei sich in diesem Falle immer herausstellte, dass die Kandidaten nicht *in frame* mit N_{Ub} fusioniert waren. Daher wurden diese Kandidaten verworfen. In **Tabelle 3.2** sind mit drei Ausnahmen nur Kandidaten aufgelistet, für die Wachstum auf 5-FOA-Selektionsplatten bei allen getesteten Kolonien nachgewiesen wurde (**B** in **Abbildung 3.8**). Für den *AtMTP1*-Kandidaten At2g47070, den *AbMTP1*-Kandidaten At2g47010 und den einzigen *AtMTP2*-Kandidaten At1g04410 wurde dieser Test bisher nicht durchgeführt. Sie sind trotzdem in der Tabelle aufgelistet, da bei diesen Kandidaten N_{Ub} *in frame* mit der cDNA der Kandidaten fusioniert war. Wie bereits angedeutet, war bei vielen Kandidaten, die nicht bestätigt werden konnten, nicht der Fall. Einige Kandidaten wurden mehrfach in derselben Bibliothek identifiziert (**Tabelle 3.2** und **3.3**), wobei lediglich At4g27500 in beiden Bibliotheken mit *AtMTP3* als *Bait* gefunden wurde.

3.3 Überprüfung der Kandidaten

Als effiziente Methode, um falsch positive Kandidaten zu identifizieren, wurde in der neueren Literatur die Verknüpfung von existierenden Daten mit den Daten des SUS beschrieben. Bei der dafür verwendeten Methode werden einer neuen Protein-Protein-Interaktion Konfidenzwerte zugeschrieben, die auf dem Verhalten der Proteine im SUS selber basieren, sowie auf Daten wie z.B. der Expression im selben Gewebe, gleiche Proteinlokalisierung, ähnlicher Mutanten-Phänotyp usw. (Miller *et al.*, 2005). Die cDNA der identifizierten *Preys* war entweder stark verkürzt (**Tabelle 3.3**) oder umfasste untranslatierte Sequenzen am 5'-Terminus. Vor der weiteren molekularbiologischen Untersuchung der Kan-

Tab. 3.2: Putative Interaktoren für *AtMTP1*, *AhMTP1*, *AtMTP2* und *AtMTP3*. Die hier aufgeführten Kandidaten wurden durch Screening von zwei Bibliotheken (LS- und FS-Bibliothek, s. ABSCHNITT 2.2) mit der in ABILDUNG 3.7 beschriebenen Methode identifiziert und verifiziert. Für die Kandidaten At3g17930 und At4g27500, die mit den *Baits AtMTP1* bzw. *AtMTP3* identifiziert wurden, erfolgte die Überprüfung gemäß ABILDUNG 3.8 zusätzlich auch mit dem jeweils anderen *Bait*. Dies führte in beiden Fällen zu einem positiven Ergebnis. Die CSB.DB-Koeffizienten sagen aus, wie stark die gefundenen Kandidaten auf Transkriptebene mit dem *Bait* korrelieren (Steinhauser *et al.*, 2004). Es wurden jeweils die Werte der Matrix angegeben, bei der die stärkste Korrelation zwischen dem Kandidaten und dem jeweiligen MTP gefunden wurde.

<i>Bait</i>	Kandidat	Annotation	...x	CSB.DB ^a		
				ident.	Spearman	P-Value
<i>AtMTP1</i>	At2g47070	squamosa promoter binding protein-like 1 (<i>AtSPL1</i>)	2	-0,32	$1,26 \cdot 10^{-2}$	atge0250
	At3g17930	expressed protein	3	-0,78	$3,15 \cdot 10^{-14}$	atge0100
	At1g50020	tubulin α -6 chain-related	1	-0,44	$3,06 \cdot 10^{-4}$	atge0100
	At5g53560	cytochrome b5 isoform 1 (<i>AtB5-A</i>) ^c	2	0,41	$2,62 \cdot 10^{-3}$	nasc0271
<i>AhMTP1</i>	At2g31800	ankyrin protein kinase, putative ^d	1	-0,43	$3,80 \cdot 10^{-4}$	atge0100
	At2g47010	expressed protein	1	-0,51	$2,68 \cdot 10^{-5}$	atge0250
<i>AtMTP2</i>	At1g04410	malate dehydrogenase, cytosolic, putative	1	—	—	—
<i>AtMTP3</i>	At3g45600	senescence-associated family protein, TET3 ^e	1	0,41	$1,17 \cdot 10^{-3}$	atge0250
	At2g32580	expressed protein	1	0,41	$1,08 \cdot 10^{-3}$	atge0250
	At4g27500	<i>AtPPI1</i> , <i>AtAHA1</i> interactor ^f	2	0,05	$6,97 \cdot 10^{-1}$	atge0250
	At1g24520	anther-specific protein <i>AtAGP1</i> ^g	1	—	—	—
	At3g17440	novel plant SNARE 13 (<i>AtNPSN13</i>)	1	0,05	$6,79 \cdot 10^{-1}$	atge0250
	At2g32720	cytochrome b5, putative isoform 4	1	0,28	$2,75 \cdot 10^{-2}$	atge0250
	At5g37310	endomembrane protein 70, putative	1	0,24	$7,02 \cdot 10^{-2}$	atge0250
	At4g27840	expressed protein	1	-0,03	$8,25 \cdot 10^{-1}$	atge0250
	At4g32530	vacuolar membrane ATPase subunit c (<i>AtVHA-c</i> "1)	1	0,39	$1,88 \cdot 10^{-3}$	atge0250

^aEin Spearman-Koeffizient von -1 bedeutet negative Korrelation; $+1$ positive Korrelation. Je kleiner der Wert P ist, umso unwahrscheinlicher ist, dass sich die Korrelation zufällig ergibt (P sollte kleiner als 0.05 sein).

^batge0100: developmental series, atge0250: abiotic stress series (roots), nasc0271: miscellaneous experiment

^cFukuchi-Mizutani *et al.* (1999)

^dKinase-Motiv annotiert durch computergestützte Vorhersage und durch Rudrabhatla *et al.* (2006).

^eAls Mitglied der Tetraspanin-Familie eingeordnet durch Cnops *et al.* (2006).

^fMorandini *et al.* (2002); Viotti *et al.* (2005). Sowohl in der LD- als auch in der FS-Bibliothek (s. Abschnitt 2.2) identifiziert.

^gXu *et al.* (1995)

didaten wurde der *gesamte* annotierte ORF aus mehreren Gründen kloniert: Zum einen könnte die Interaktion des verkürzten Proteins mit dem jeweiligen *Bait*-MTP ein Artefakt sein, weshalb die Interaktion mit dem vollständigen Protein überprüft werden sollte. Zudem wurden weitergehende Tests geplant, welche ein funktionales Kandidaten-Protein voller Länge voraussetzen. Untranslatierte 5'-Sequenzen könnten wiederum bei diesen weitergehenden Experimenten unerwünschte modifizierende Auswirkungen auf die Expressionsstärke haben. Für die Klonierung wurde der ORF mittels PCR aus einer *A. thaliana*-cDNA-Bibliothek amplifiziert und in den Gateway[®]-Entry-Vektor pENTR/D kloniert (Abschnitt 2.1.13). Es wurde durch Sequenzierung sichergestellt, dass alle Kandidaten fehlerfrei in pENTR/D vorlagen. In fast allen Fällen stimmte der vorhergesagte ORF mit dem ORF überein, der von der cDNA im *Prey*-Vektor und der neu klonierten cDNA kodiert wird. Nur bei At5g37310 lag

die *Splice site* des letzten Exons in zwei sequenzierten Klonen 94 bp vor (*upstream*) der vorhergesagten. Daraus ergibt sich ein anderer Leserahmen für dieses Exon mit einem Stop-Codon, das 7 bp vor dem vorhergesagten liegt. Diese identifizierte *Splice site* liegt auch in der einzigen annotierten cDNA (Acc.Nr. gi|42459532) vor. Auch wenn die vorhergesagte *Splice site* nicht ausgeschlossen werden kann, wird aufgrund der vier cDNA-Klone davon ausgegangen, dass dies eine falsche Vorhersage ist. Für weitere in **Abschnitt 3.3.1** erörterte Experimente zur Überprüfung der Kandidaten wurde der ORF mittels der Gateway®-Technologie in die in **Tabelle 3.3** angegebenen Ziel-Vektoren kloniert. Weiterhin ist in dieser Tabelle die Anzahl der vorhergesagten Transmembranhelices und die vorhergesagte subzelluläre Lokalisierung angegeben. Da für die eingesetzten *Baits* die subzelluläre Lokalisierung weitestgehend bekannt ist (vakuolär für MTP1 und -3 (Arrivault *et al.*, 2006; Dräger *et al.*, 2004); MTP2 siehe **Abschnitt 4.2.4**), helfen diese Informationen bei der Einschätzung, welche Kandidaten biologisch relevante Interaktoren sein könnten (**Abschnitt 6.1**).

3.3.1 Untersuchung der Kandidaten in anderen Varianten des *Split Ubiquitin System*

Der Tropfenest in **Abbildung 3.8** diente der Bestätigung der Interaktion der *Baits* mit den Kandidaten, welche im *Prey*-Vektor vorliegen. Die vom *Prey*-Vektor kodierte N_{Ub} -Variante ist N_{Ub1} , welches die größte Affinität zu C_{Ub} aufweist (**Abbildung 1.2**). Die N_{UbA} - und N_{UbG} -Varianten haben eine geringere Affinität zu C_{Ub} . Starke Interaktoren sollten auch im Falle der Fusion mit diesen weniger affinen N_{Ub} -Varianten mit dem zugehörigen MTP interagieren und die Formation von Ubiquitin aus den beiden Hälften unterstützen. Diese Kandidaten sollten folglich bei einem analog zu **Abbildung 3.8** durchgeführten Tropfenest positiv getestet werden. Um somit die Interaktion auf unterschiedlich stringente Weise zu testen, wurden die in **Tabelle 3.2** aufgeführten Kandidaten in pNubAGW und pNubGGW kloniert. Die Interaktionstests wurden wie in **Abbildung 3.8** beschrieben durchgeführt. Für keinen der getesteten Kandidaten konnte bei Verwendung von pNubGGW oder pNubAGW Wachstum auf 5-FOA-Selektionsmedium beobachtet werden; d. h. durch dieses stringenter System wurde keine Interaktion angezeigt. Unter anderem wurde vermutet, dass die Änderungen der Sequenz zwischen N_{Ub} und den identifizierten cDNA Fragmenten, die sich aus der Neuklonierung ergeben, hierbei eine Rolle spielen. Wie in **Abschnitt 6.1** näher diskutiert wird, hat diese Sequenz entscheidenden Einfluss auf die räumliche Orientierung der beiden Komponenten des *Prey*-Hybridproteins zueinander. Die räumliche Orientierung von N_{Ub} zum fusionierten *Prey*-Protein ist wiederum kritisch für die Anzeige der Interaktion. Um den Einfluss dieser Änderungen abzuschätzen, wurden zwei Kandidaten in den Vektor pNubIGW kloniert. Dieser kodiert wie die Bibliotheksvektoren pGOi und pCUP-CGK die N_{Ub1} -Variante – mithin sollte beim Interaktionstest mit pNubIGW für beide Kandidaten das gleiche Ergebnis wie in **Abbildung 3.8** erhalten werden. Wie in **Abbildung 3.9** zu sehen, war dies nicht der Fall.

Dies könnte – neben den in **Abschnitt 6.1** diskutierten Gründen – darauf hindeuten, dass die Anzeige

Vektor	Kandidat	AS	mit 5-FOA	ohne 5-FOA		
pCUP-CGK	At4g27500	517–612		4/4		At4g27500 im Vektor pCUP-CGK entspricht dem schon in dieser Abbildung getesteteten (verkürzten) cDNA-Klon, der im Screen identifiziert wurde. Dahingegen liegt im Vektor pNubIGW der vollständige ORF der beiden getesteteten Kandidaten vor (vergl. TABELLE 3.3). Neben diesen Unterschieden unterscheiden sich die <i>Prey</i> -(N_{Ub})-Vektoren unter anderem in der Sequenz zwischen N_{Ub} und der cDNA (<i>Linker</i> -Sequenz, s. ANHANG A.2).
pNubIGW	At4g27500	1–612		0/4		
pNubIGW	At5g37310	1–594		0/4		

Abb. 3.9: Einfluss unterschiedlicher N_{Ub} -Vektoren auf das Ergebnis des Interaktionstest im SUS. Der Test wurde wie in **ABBILDUNG 3.8** beschrieben durchgeführt. Der Kandidat

der Interaktion tatsächlich sehr entscheidend von der Sequenz zwischen N_{Ub} und dem identifizierten Fragment abhängt. Die für die Stringenztests eingesetzten Vektoren pNubAGW und pNubGGW sind – bis auf die Aminosäure 13 von N_{Ub} – identisch zu pNubIGW. Auch wenn es bisher nur für zwei Kandidaten gezeigt wurde, bedingen die Veränderungen durch die Neuklonierung mutmaßlich auch bei den anderen Kandidaten das negative Ergebnis der Stringenztests – und nicht die N_{Ub} -Varianten.

3.3.2 Einfluss der Kandidaten auf die Zn-Homöostase in Hefe

Es ist vorstellbar, dass die Interaktionskandidaten den Einfluss der heterolog exprimierten *Arabidopsis*-CDF auf die Zn-Homöostase in Hefe modifizieren; auch wenn es sich um ein heterologes System handelt. Um dies zu überprüfen, sollten die Kandidaten mit dem jeweiligen *Bait*-MTP im Zn-hypersensitiven Hefestamm *zrc1 cot1* exprimiert werden. Sollte die Expression des Kandidaten hierbei niedriger sein die Expression des CDF, könnte ein eventuell vorhandener Effekt des Kandidaten auf den CDF schwer beobachtbar sein, da er nur für eine Teilpopulation aller Proteinkopien des CDF wirksam sein könnte. Daher wurden die CDFs in den *single copy*-Vektor pFL38GW kloniert und die Kandidaten in den *multi copy*-Vektor pFL613GW. Die Expression erfolgte jeweils unter Kontrolle des konstitutiven PGK1-Promotors. Um auszuschließen, dass beobachtete Wachstumsunterschiede durch den Kandidaten allein ausgelöst wurden, wurde zum Vergleich *zrc1 cot1* nur mit den Kandidaten in pFL613GW transformiert. In **Abbildung 3.10** ist dieses Experiment für die *AtMTP3*-Interaktionskandidaten dargestellt. Für die *zrc1 cot1* (*AtMTP3*; *ev*)-Kontrolle im Falle der Doppeltransformanten und die *zrc1 cot1* (*ev*)-Kontrolle der Einzeltransformanten wurden zwei Tropfentests dargestellt, die mit denselben Verdünnungen hergestellt wurden (technische Replikate), um die Variabilität innerhalb eines Genotyps zu illustrieren. Anhand dessen ist ersichtlich, dass es trotz identischer Zellzahlen unter Kontrollbedingungen ($2 \mu\text{M Zn}$) zu Wachstumsunterschieden zwischen isogenen Klonen kommen kann. Die Auswertung wurde unter Berücksichtigung dieses Umstandes vorgenommen. Es ist ersichtlich, dass alle Kandidaten, mit Ausnahme von At5g37310, nur einen sehr subtilen Einfluss auf die Zn-Sensitivität von *AtMTP3*-exprimierenden *zrc1 cot1* Zellen haben. Den deutlichsten Einfluss hat At5g37310, der zu einer erhöhten Zn-Sensitivität im Vergleich zu *zrc1 cot1* (*MTP3*, *ev*) führt. Allerdings ist dieser Effekt

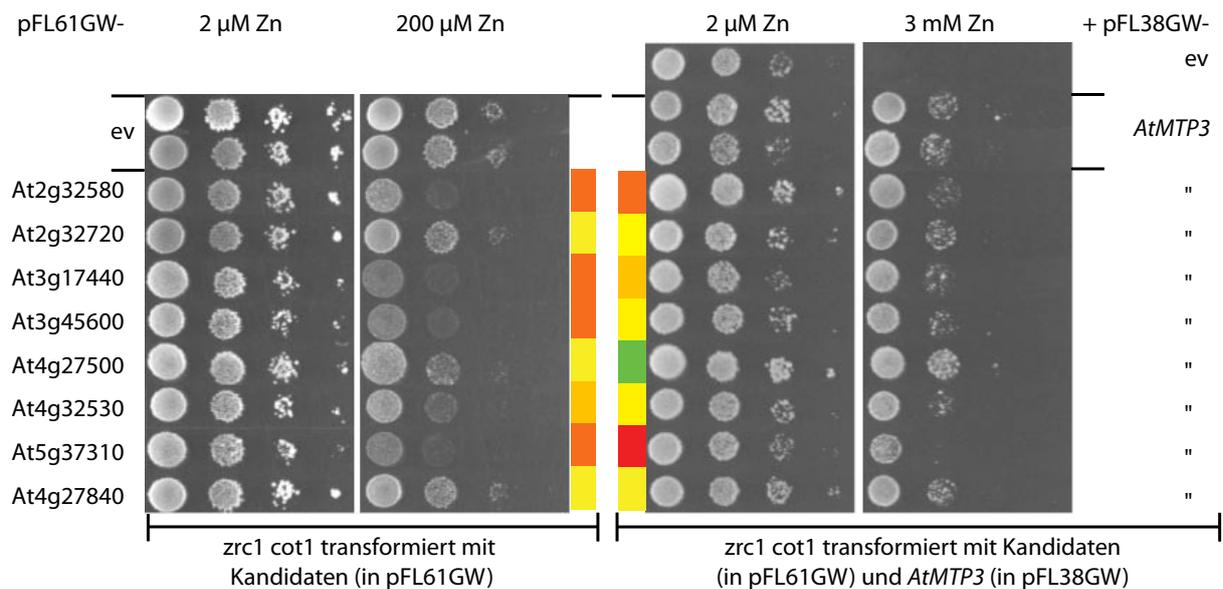


Abb. 3.10: Einfluss der Kandidaten auf die Zn-Homöostase in Hefe. Die *zrc1 cot1* Doppelmutante wurde transformiert mit *AtMTP3* in pFL38GW und den Kandidaten in pFL613GW. Doppeltransformanten wurden selektiert durch Plattieren auf SC –HIS –URA. Einzeltransformanten von *zrc1 cot1* mit den Kandidaten in pFL613GW wurden durch plattieren auf SC –URA selektiert. Übernachtskulturen wurden mit Wasser + 0,2 % (V/V) Tween 20 gewaschen und Verdünnungsstufen von $OD_{600} = 0,5, 0,05, 0,005$ und $0,0005$ hergestellt. Davon wurden 10 µl auf LSP Platten getropft (Doppeltransformanten: –HIS –URA, Einzeltransformanten: –URA), die für Kontrollbedingung 2 µM Zn und für Hoch-Zn 3 mM/0,2 mM Zn (Doppel-/Einzeltransformanten) enthielten. Die Erhöhung oder Erniedrigung der Zn-Sensitivität durch die Kandidaten im Vergleich zur Kontrolle (Doppeltransformanten: *zrc1 cot1* (*AtMTP3*; ev), Einzeltransformanten: *zrc1 cot1* (ev)) wurde farbkodiert: *gelb* Zn-Sensitivität entspricht der Kontrolle, *rot* erhöhte Zn-Sensitivität, *grün* geringere Zn-Sensitivität. Für die Doppeltransformanten wurden in zwei Experimenten insgesamt fünf unabhängige Klone getestet. Für die Einzeltransformanten wurden in einem Experiment drei unabhängige Klone getestet. Dargestellt sind repräsentative Klone.

unter Zn-Stressbedingungen auch bei der Einzeltransformante *zrc1 cot1* (At5g37310) zu beobachten. Daher ist davon auszugehen, dass dieser Effekt nicht auf eine Interaktion zwischen At5g37310 und *AtMTP3* zurückgeht. Auch für At2g32580 und At3g17440 wurde sowohl für die Doppeltransformanten, als auch für die Einfachtransformanten eine erhöhte Zn-Sensitivität beobachtet. Hierbei war der Einfluss auf die Zn-Sensitivität durch den Kandidaten allein deutlich ausgeprägter als in den Doppeltransformanten. Einen ebenso starken inhibitorischen Effekt unter Zn-Stressbedingungen durch den Kandidaten allein wurde bei At3g45600 beobachtet, wohingegen in den entsprechenden Doppeltransformanten kein Effekt beobachtet wurde. Nur bei At4g27500 ist eine leicht geringere Zn-Sensitivität der Doppeltransformanten zu beobachten, wohingegen kein Effekt durch den Kandidaten allein auftrat. Diese Ergebnisse zeigen, dass der – in fast allen Fällen beobachtete – Einfluss auf die Zn-Sensitivität durch den Kandidaten *allein*, die Interpretation der Ergebnisse der Co-Expression mit *AtMTP3* erschwert, da sich hierbei negative und positive Einflüsse auf das Wachstum der Hefen überlagern. Die Konsequenzen hieraus werden in **Abschnitt 6.3** diskutiert.

3.4 Biochemische Experimente zur Identifikation von *AtMTP3*-Interaktoren

Neben dem genetischen Ansatz bieten sich auch einige biochemische Experimente an, um potentielle Interaktoren für MTPs zu identifizieren. Für diese Experimente wurden Proteine aus Blättern von *A. thaliana*-Linien isoliert, die *AtMTP3* mit einem N-terminalen HA-Tag überexprimieren (Arrivault *et al.*, 2006). Der hierfür verfügbare HA-Antikörper ist für Experimente wie Co-Immunopräzipitation und *Western Blots* notwendig, da kein ausreichend guter Antikörper für *AtMTP3* verfügbar war. Für die Co-Immunopräzipitation wäre es notwendig, neben dem für die Präzipitation eingesetzten HA-Antikörper einen spezifischen Anti-*AtMTP3*-Antikörper für die Detektion im *Western Blot* zur Verfügung zu haben. Daher wurde versucht, höhermolekulare Komplexe im nativen Proteingel zu identifizieren, bei dem die Proteine ähnlich zu einem SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt werden (Schrägger und Jagow, 1991). Obwohl nach Auftrennung mittels eines SDS-Gels *AtMTP3* im *Western Blot* bei Benutzung des Anti-HA-Antikörpers nachgewiesen werden konnte (Arrivault *et al.*, 2006), gelang dies nicht nach Auftrennung mittels *Blue native PAGE* (Abbildung 3.11). Es stellte sich heraus, dass der

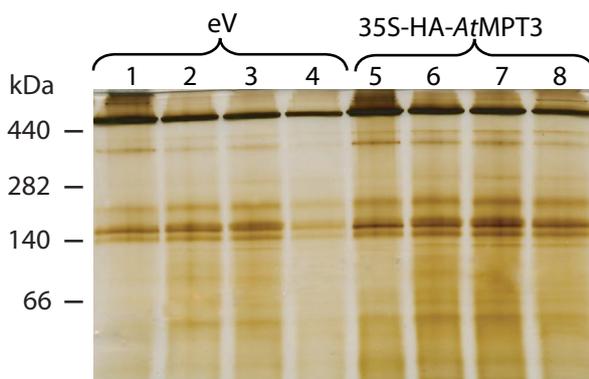


Abb. 3.11: Identifizierung von höhermolekularen Proteinkomplexen durch *Blue Native PAGE* (7,5–16,5 % Acrylamid-Gradient, s. Schrägger und Jagow, 1991; Silberfärbung). Im parallel durchgeführten *Western Blot* wird mit dem Anti-HA-Antikörper nur die 560 kDa-Bande des RubisCo-Komplexes unspezifisch detektiert. Spuren: 1,5 Gesamtprotein, 2,6 10000 × g Überstand, 3,7 100000 × g Überstand, 4,8 100000 × g Pellet (mikrosomale Fraktion)

verwendete HA-Antikörper nicht mehr funktional war. Für einen weiteren Versuch wurde Wurzelmaterial der oben erwähnten Linien isoliert, die auf Platten mit 30 μ M Zn angezogen wurden. Unter diesen Bedingungen wird *AtMTP3* in Wildtyppflanzen exprimiert, weshalb angenommen wird, dass auch putative Interaktoren unter diesen Bedingungen in diesem Gewebe exprimiert werden. Ein zukünftiges Experiment – die Isolation von Proteinen der mikrosomalen Fraktion und die Auftrennung der Proteinkomplexe im *Blue native Gel* – wurde bisher aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

Tab. 3.3: Übersicht über die Kandidaten: *In silico*-Analyse und Klonierungen. Zusätzlich zu den Kandidaten in TABELLE 3.2 ist At5g54940 aufgeführt: Dieser *AtMTP1* Kandidat konnte gemäß Schritt sechs und sieben in ABILDUNG 3.7 nicht bestätigt werden und diente bei allen folgenden Experimenten als negative Kontrolle. In den ersten fünf Spalten ist angegeben, in welchem Screen die Kandidaten identifiziert wurden (Übersicht in TABELLE 3.1), die Größe des annotierten ORF, die Anzahl der den ORF kodierenden Exons und wieviel Nukleotide am 5'-Terminus der identifizierten *Prey*-cDNA fehlen. *In silico*-Analyse der subzellulären Lokalisation wurde mit ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003) und LOCTREE (Nair und Rost, 2005) durchgeführt; experimentelle Daten wurden durch Abfrage der SUBA-Datenbank (Heazlewood *et al.*, 2005) erhalten. ARAMEMNON vereint (nur für Membranproteine) TARGETP, PREDOTAR, iPSORT, CHLOROP, PCLR, MITOPROT, MITOPRED, SIGNALP HMM und SIGNALP NN bei der Vorhersage. Aufgelistet ist die vorhergesagte Anzahl an Transmembranhelices (TM) und der Durchschnittswert der am häufigsten vorhergesagten Lokalisierung (0–unwahrscheinlich, 1–sehr wahrscheinlich). Das hierarchische System LOCTREE simuliert die zellulären Mechanismen bei der Vorhersage der Lokalisierung, ist aber bisher nicht für Membranproteine geeignet. Angegeben ist der *Reliability Index* zwischen 0 (niedrig) und 10 (sicher). Prozentuale Angaben stehen für den *LOCKey*-Wert einer weitergehenden SWISS-PROT-Schlüsselwortsuche unter hoch homologen Proteinen. Abkürzungen: C Chloroplast, CW Zellwand, Cy Zytoplasma, ER Endoplasmatische Retikulum, Ex Extrazellulär, N Zellkern, ND nicht DNA bindend, M Mitochondrium, S *Secretory pathway*, VM vakuoläre Membran. Vakuoläre Lokalisation kann weder von ARAMEMNON noch von LOCTREE genau vorhergesagt werden und ist hier Teil der Kategorie S oder Ex. Die letzten Spalten (pNubGGW bis pFL613GW) kennzeichnen die Ziel-Vektoren, in welche der vollständige ORF – nach Klonierung in pENTR/D – mit der Gateway®-Technologie kloniert wurde.

Kandidat At-Nr. (<i>Bait</i>) <i>At/AbMTP</i>	Screen, cDNA- Bib.	Größe (bp)	Exons (ORF)	<i>Prey</i> -cDNA verkürzt um... (bp)	Lokalisation (vorhergesagt/experimentell)			pNubG GW	pNubA GW	pNubI GW	pFL613 GW	
					ARAMEMNON TM	LOCTREE	exp.					
At5g54940 (1)	4 ^{LD}	339	1	0	0	—	C (1)	—	+	+	—	+
At2g47070 (1)	4 ^{LD}	2646	10	2430	1	C (0,2)	N (95 %)	—	—	—	—	—
At3g17930 (1)	4,5 ^{LD}	573	5	0	2	C/M (0,6)	C/M (8), C(5)	C ^a	+	+	—	+
At1g50020 (1)	5 ^{LD}	630	4	207	1	C (0,8)	Cy(3)	C ^b	+	+	—	+
At5g53560 (1)	6 ^{FS}	405	3	171	1	—	ER (100 %)	PM/C ^c	—	—	—	—
At2g31800 (1)	6 ^{LD}	1431	12	924	0	—	Cy (90 %)	—	—	—	—	—
At2g47010 (1)	4 ^{LD}	1356	3	0	0	—	Ex (9)	—	—	—	—	—
At1g04410 (2)	6 ^{LD}	999	7	0	0	—	Cy(3); M (71 %)	N/PM ^d	—	—	—	—
At3g45600 (3)	4 ^{LD}	855	2	429	3	S (0,7)	S (3), Ex (2)	PM ^e	+	+	—	+
At2g32580 (3)	5 ^{LD}	540	3	0	0	—	Ex (8)	—	+	+	—	+
At4g27500 (3)	5 ^{LD} ,6 ^{FS}	1836	6	1551 ^f	1	—	N(1)	PM ^g	+	+	+	+
At1g24520 (3)	5 ^{LD}	378	1	0	0	S (1,0)	Ex (10)	PM ^b	—	—	—	—
At3g17440 (3)	5 ^{LD}	807	10	492	1	—	Cy (1)	PM ⁱ	+	+	—	+
At2g32720 (3)	5 ^{LD}	402	3	0	1	—	ER (100 %)	—	+	+	—	+
At5g37310 (3)	5 ^{LD}	1782	7 ^j	1467	7	S(0,8)	N (1), ND (9)	CW ^k	+	+	+	+
At4g27840 (3)	5 ^{LD}	783	1	354	1	S (0,6)	N(6)	—	+	+	—	+
At4g32530 (3)	5 ^{LD}	543	4	0	4	C/M (0,4)	N(6)	—	+	+	—	+
<i>AtMTP1</i>					6	—	Ex (9)	VM ^l				
<i>AtMTP2</i>					6	C/M (0,6)	Ex (9)	ER(?) ^m				
<i>AtMTP3</i>					7	C/M (0,7)	Ex (9)	VM ⁿ				

^aBestandteil des Thylakoidmembran-Proteoms (Peltier *et al.*, 2004; Friso *et al.*, 2004 [MassSpec]).

^bBestandteil des Thylakoidmembran-Proteoms (Peltier *et al.*, 2004 [MassSpec]).

^cLokal. in der Plasmamembran (Marmagne *et al.*, 2004 [GFP])/Bestandteil des Thylakoidmembran-Proteoms (Peltier *et al.*, 2004 [MassSpec]).

^dBestandteil des Nukleus- (Bae *et al.*, 2003 [MassSpec]) oder des Plasmamembran-Proteoms (Alexandersson *et al.*, 2004 [MassSpec]).

^eBestandteil des Plasmamembran-Proteoms (Alexandersson *et al.*, 2004; Marmagne *et al.*, 2004 [MassSpec]).

^fDer in der FS-Bibliothek identifizierte Kandidat ist am 5'-Terminus um 1520 bp verkürzt.

^gBestandteil des Plasmamembran-Proteoms (Nühse *et al.*, 2003 [MassSpec]).

^hVerankert in der Plasmamembran über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Borner *et al.* (2003, 2002) [Vorhersage und MassSpec].

ⁱBestandteil des Plasmamembran-Proteoms (Alexandersson *et al.*, 2004; Marmagne *et al.*, 2004 [MassSpec], Uemura *et al.*, 2004 [GFP]).

^jLaut Vorhersage umfasst Exon sieben 133 bp; die cDNA des *Prey* und des klonierten *full length*-ORF kodiert ein 220 bp Exon in einem anderen Leserahmen. Die hier identifizierte *Splice site* wird durch die Sequenz des einzigen annotierten cDNA-Klon gi|42459532 gestützt.

^kBestandteil des Zellwand-Proteoms (Bayer *et al.*, 2006 [MassSpec]).

^lLokalisiert in der vakuolären Membran (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Kobae *et al.*, 2004 [GFP]).

^mDiese Arbeit (Abschnitt 4.2.4 [GFP]).

ⁿLokalisiert in der vakuolären Membran (Arrivault *et al.*, 2006 [GFP]).

4 Resultate Teil B: Funktionelle Charakterisierung von *AtMTP2* und *AtMTP12*

4.1 Funktionelle Charakterisierung von *AtMTP12*

4.1.1 5'-RACE und Klonierung von *AtMTP12*

Für *AtMTP12* existierten zwei computergestützte Genmodelle, die sich in der Länge der vorhergesagten ORFs unterschieden. Der vom *Munich Information Center for Protein Sequences* (MIPS) vorhergesagte ORF kodiert dabei ein typisches Protein der CDF-Familie mit sechs Transmembranhelices. Gemäß der Vorhersage von *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) ist dieses Protein jedoch fusioniert mit einem N-terminalen Protein unbekannter Funktion (**Abbildung 4.1**). Für keines der beiden vorhergesagten Genmodelle konnten innerhalb der entsprechenden Promotorregionen bis -500 bp (bezügl. des jeweiligen putativen Start-ATG) klassische Promotorelemente wie die TATA- oder CAAT-Box gefunden werden (analysiert mittels PLACE,¹ Higo *et al.*, 1999). Um die korrekte

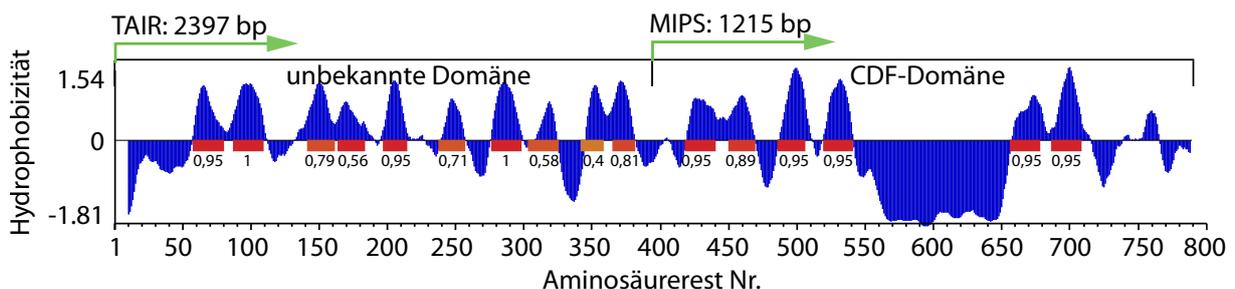


Abb. 4.1: Computergestützte Vorhersage von *AtMTP12*: Durch TAIR bzw. MIPS werden unterschiedliche ORFs für *AtMTP12* vorhergesagt. Der Hydrophobizitätsplot der zwei Proteindomänen wurde gemäß Kyte und Doolittle (1982) als gleitender, gewichteter Mittelwert in Fenstern von jeweils 21 Aminosäuren berechnet. Rot markiert wurden Transmembranhelices, die aufgrund eines Konsensusentscheides (0–unwahrscheinlich, 1–sehr sicher) von ARAMEMNON vorhergesagt wurden (Schwacke *et al.*, 2003). Der von MIPS vorhergesagte ORF kodiert ein typisches Protein der CDF-Familie mit den hierfür charakteristischen sechs Transmembranhelices. Laut der Vorhersage von TAIR ist dieses Protein fusioniert mit einem N-terminalen Protein, das keine Homologie zu bekannten Proteinen zeigt.

mRNA-Sequenz zu erhalten, wurde 5'-RACE durchgeführt. In **Abbildung 4.2** ist dargestellt, dass da-

¹<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>

bei ausschließlich die von TAIR vorhergesagte Sequenz erhalten wurde (Sequenz in **Anhang A.1.2**). Damit wurde bestätigt, dass *AtMTP12* tatsächlich eine Fusion eines unbekanntes Proteins mit einem Protein der CDF-Familie ist. Die MIPS-Annotation des *AtMTP12*(At2g04620)-ORF basiert somit auf einer falschen Vorhersage.² Schon bei der Klonierung des 5'-RACE-Fragments, welches am 5'-Ter-

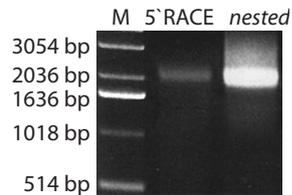


Abb. 4.2: 5'-RACE von *AtMTP12* wurde mit dem SMART™ RACE cDNA-AMPLIFICATION-Kit von Clontech durchgeführt. Selbst unter Bedingungen, welche die Amplifikation der kürzeren, von MIPS vorhergesagten, Sequenz bevorzugten, wurde ausschließlich die Sequenz erhalten, die der TAIR-Vorhersage entspricht (vergl. **ABBILDUNG 4.1**).

minus nur 294 bp kürzer als der identifizierte *AtMTP12*-ORF ist, wurde ein sehr schlechtes Wachstum der transformierten *E. coli*-Zellen beobachtet, obwohl der verwendete Vektor pENTR/D keinerlei Expression der Sequenz zulassen sollte. Beim Versuch der Klonierung der vollen kodierenden Sequenz von *AtMTP12* in *E. coli* wurden keine Klone mit der korrekten Sequenz erhalten. In allen Fällen hatten Sequenzumlagerungen stattgefunden. Dies konnte auch durch verschiedene Klonierungsstrategien und unter Verwendung verschiedener *E. coli*-Stämme und -Vektoren nicht umgangen werden. Ursache hierfür ist wahrscheinlich der hohe A/T Gehalt des 5'-Bereichs des ORF von *AtMTP12* (bis zu 62 %). A/T reiche Sequenzen enthalten potentiell Promotor-ähnliche Sequenzen, welche in *E. coli* die Transkription von Sequenzen, unabhängig vom benutzten Klonierungsvektor und der Orientation der cDNA, initiieren (Fakhfakh *et al.*, 1996). Im Falle von *AtMTP12* könnte dies bedeuten, dass durch die Promotoraktivität des 5'-Bereichs toxische Mengen der CDF-Domäne gebildet werden. Für viele Membranproteine wird Toxizität in *E. coli* beobachtet (Stewart *et al.*, 1998). Es gelang letztendlich, *AtMTP12* mittels homologer Rekombination in Hefe zu klonieren. Dabei wurde mittels PCR ein *AtMTP12*-Fragment amplifiziert, welches an den 3'- und 5'-Enden jeweils 40 bp Überlappungen mit dem Vektor pM-Cub enthielt, die mit den Primern eingeführt wurden. Der Hefestamm JD53 wurde mit diesem Fragment und dem linearisierten pM-Cub-Vektor transformiert. Der Vektor pM-Cub liegt in Hefe nur mit ein bis zwei Kopien vor. Sollte *AtMTP12* in Hefe mit einem vergleichbaren Mechanismus wie in *E. coli* toxisch sein, würden die Effekte durch den *low copy*-Vektor möglichst gering gehalten. Für die Sequenzierung der nach der homologen Rekombination erhaltenen Plasmide wurden die Plasmide dieser Transformanten isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Auch bei diesem Amplifikationsschritt wurde wieder das sehr schlechte Wachstum der *E. coli*-Zellen beobachtet. Der durch die Toxizität entstehende Selektionsdruck für Mutationen ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass keine fehlerfreie Sequenz erhalten wurde. Aus diesem Grunde wurde keines der amplifizierten Plasmide für weitere Experimente verwendet.

²Accession Nr. gi|20198214

4.1.2 Heterologe Expression von *AtMTP12* in verschiedenen Hefemutanten

Um zu bestimmen, welche zelluläre Funktion *AtMTP12* hat, wurden Komplementationstests in Hefe durchgeführt. Einer der dafür verwendeten Hefestämme, *zrc1*, ist Zn-, Co- und Cd-hypersensitiv. *Zrc1* ist ein vakuolärer Metalltransporter der CDF-Familie. Da *AtMTP12* erfolgreich mittels homologer Rekombination im Hefestamm JD53 unter Verwendung des *low copy*-Vektors pM-Cub kloniert werden konnte, wurde dieser Vektor auch für die Klonierung in der Hefemutante *zrc1* verwendet. Da im Vektor pM-Cub *AtMTP12* als Fusionsprotein mit C_{UB} und Ura3p vorliegt (Abbildung 1.2), wurde zur Expression von *AtMTP12* *alleine* parallel die homologe Rekombination mit dem *multi copy*-Expressionsvektor pFL61GW versucht. In diesem Falle konnten allerdings keine positiven Klone identifiziert werden. Wegen der höheren zu erwartenden Transkript- und Proteinmengen bei Verwendung eines *multi copy*-Vektors, deutet dies möglicherweise auf Toxizität von *AtMTP12* auch in Hefe hin. Mit den Klonen von *AtMTP12* in pM-Cub wurden Tropfentests auf LSP-Agarosemedien durchgeführt, die verschiedene Konzentrationen an Co, Cu, Fe, Ni, Mn und Zn enthielten. In keinem Fall konnte ein Wachstumsunterschied zwischen den *AtMTP12*-Transformanten von *zrc1* und der Leervektorkontrolle von *zrc1* beobachtet werden.

AtMTP12 weist von allen *A. thaliana*-CDFs-Proteinen die größte Homologie zu *ScMsc2* auf. *ScMsc2* ist ein Mitglied der CDF-Familie in *S. cerevisiae* und ist zusammen mit *Zrg17* involviert im Zn-Transport in das ER (Ellis *et al.*, 2005). Um zu überprüfen, ob *AtMTP12* die *Unfolded Protein Response* (UPR) der *msc2*-Mutante komplementiert, wurde ein weiteres mal versucht, *AtMTP12* mittels homologer Rekombination in den Expressionsvektor pFL61GW zu klonieren. Auch diesmal konnten keine positiven Klone identifiziert werden. Die Klonierung in den Vektor pM-Cub oder in einen anderen *low copy*-Vektor wie pFL38 wurde in diesem Fall bisher nicht versucht.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von *AtMTP2*

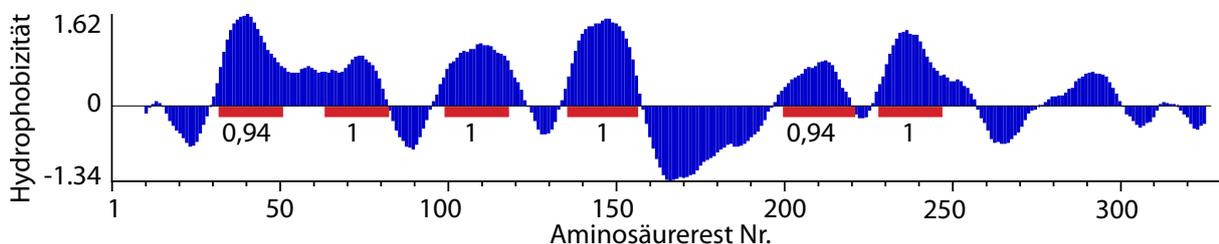


Abb. 4.3: Der Hydrophobizitätsplot von *AtMTP2* wurde gemäß Kyte und Doolittle (1982) als gleitender, gewichteter Mittelwert in Fenstern von jeweils 21 Aminosäuren berechnet. Rot markiert wurden Transmembranhelices, die aufgrund eines Konsensusentscheides (0–unwahrscheinlich, 1–sehr sicher) von ARAMEMNON vorhergesagt wurden (Schwacke *et al.*, 2003). Sechs Transmembranhelices sind typisch für Proteine der CDF Familie.

4.2.1 Heterologe Expression von *AtMTP2* in verschiedenen Hefemutanten

Um herauszufinden, welche zelluläre Funktion *AtMTP2* hat, wurden Komplementationstest in Hefe durchgeführt. Einer der dafür verwendeten Hefestämme, *zrc1 cot1*, ist Zn-, Co- und Cd-hypersensitiv. Die Mitglieder der CDF-Familie *Zrc1* und *Cot1* sind vakuoläre Metalltransporter (Conklin *et al.*, 1994). Der zweite verwendete Stamm, *ccc1*, ist sensitiv gegenüber erhöhten Fe-Konzentrationen. *Ccc1* ist ein vakuolärer Transporter für Fe (Li und Kaplan, 2004). Ein weiterer für die heterologe Expression von *AtMTP2* verwendeter Hefestamm ist die Deletionsmutante *ycf1*, welcher der vakuoläre Glutathion-Konjugat-Transporter *Ycf1* fehlt. Dieser Transporter wurde identifiziert aufgrund seiner Fähigkeit Toleranz gegenüber erhöhten Cd-Konzentrationen zu verleihen (Szczyпка *et al.*, 1994). Da *Ycf1* diverse Glutathion-S-konjugierte Xenobiotika in die Vakuole transportiert (und somit detoxifiziert), ist *ycf1* hypersensitiv gegenüber einer Reihe von Metallen, z. B. Cd, Hg und As (Ghosh *et al.*, 1999; Gueldry *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1997). Als letzte Mutante wurde *msc2* verwendet. Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 erwähnt, ist *Msc2* ein Mitglied der CDF-Familie in *S. cerevisiae* und zusammen mit *Zrg17* involviert im Zn-Transport in das ER (Ellis *et al.*, 2005). Da Zn essenziell für die korrekte Faltung vieler Proteine im ER ist, wird bei niedrigen Zn-Konzentrationen als Teil des Phänotyps dieser Mutante eine UPR beobachtet. Sollte *AtMTP2* in der Lage sein bei heterologer Expression in Hefe Zn in das ER zu transportieren, wird Komplementation dieses Phänotyps erwartet. In **Abbildung 4.4** ist zu sehen,

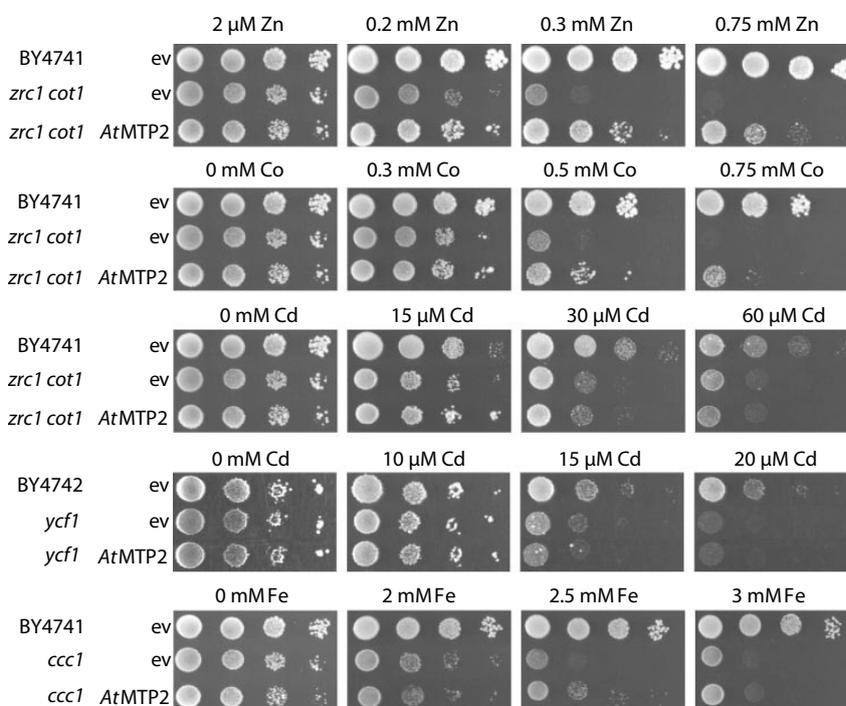


Abb. 4.4: Heterologe Expression von *AtMTP2* in verschiedenen Hefemutanten für Komplementationstests. Die Hefemutanten *zrc1 cot1* und *ccc1* wurden mit der *AtMTP2*-cDNA in pFL61GW und pFL61ev transformiert. BY4741 und BY4742 wurden mit pFL61GW (ev) transformiert. Transformanten wurden selektiert durch Plattieren auf SC-URA. Übernachtkulturen wurden mit Wasser + 0,2% (V/V) Tween 20 gewaschen und Verdünnungsstufen von $OD_{600} = 0,5, 0,05, 0,005$ und $0,0005$ hergestellt. Davon wurden je $10 \mu\text{l}$ auf LSP-URA-Agarosemedien getropft, welche unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Metalle enthielten.

dass *AtMTP2* die Zn-Toleranz von *zrc1 cot1* erhöhte, also die Mutante teilweise komplementierte. In geringerem Maße wurde auch die Toleranz der Mutante gegenüber Co erhöht, wohingegen bei Cd

keinerlei durch *AtMTP2* vermittelter Effekt auftrat. Dies wird bestätigt durch die heterologe Expression von *AtMTP2* in *ycf1*, wo ebenfalls kein Effekt von *AtMTP2* auf die Cd-Sensitivität der Mutante beobachtet wurde. Sehr gering erhöhte Fe-Toleranz zeigen mit *AtMTP2* transformierte *ccc1*-Zellen. Die UPR der *msc2*-Mutante wird durch heterologe Expression von *AtMTP2* in dieser Mutante nicht komplementiert (Abbildung 4.5). Durch morphologische Analysen wurde der Einfluss von *AtMTP2* auf einen zweiten Aspekt des Phänotyps von *msc2* untersucht: Zellen von *msc2* sind abnormal groß im Vergleich zum Wildtyp BY4741 ($\approx 2\times$). Im Vergleich zum Wildtyp wurden Zellen doppelter Größe auch bei *msc2*-Zellen beobachtet, die mit *AtMTP2* transformiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass *AtMTP2* in Hefe nicht in der Lage ist, Zn in das ER zu transportieren.

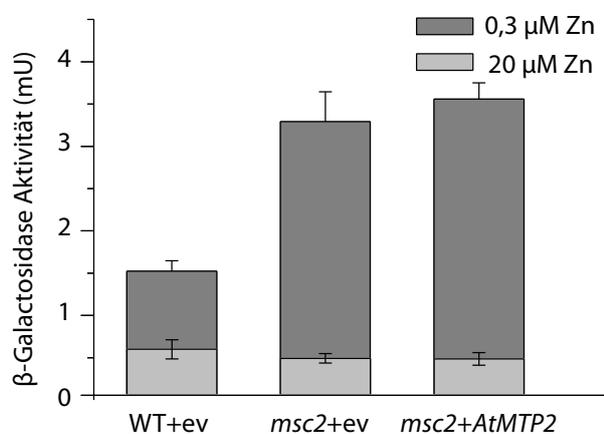


Abb. 4.5: *AtMTP2* komplementiert nicht die UPR von *msc2*. Die Hefemutante *msc2* wurde transformiert mit der *AtMTP2*-cDNA in pFL61GW und mit pFL61GW (ev). Der Wildtyp BY4741 wurde transformiert mit pFL61GW (ev). Übernachtkulturen der Transformanten wurden in Low Zinc Medium (LZM)–URA angesetzt, das 10 μM Zn enthielt. Nach Waschen der Hefen in Wasser wurden Hauptkulturen in LZM-Medium angeimpft, das 0,3 bzw. 20 μM ZnSO₄ enthielt. Nach fünf Stunden wurden β-Galactosidase-Assays mit Proteinextrakten gemäß Rose und Botstein (1983) durchgeführt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert ± SD aus einem Experiment mit je fünf unabhängigen Transformanten. Präsenz von *AtMTP2* in den *msc2*-Transformanten wurde mittels PCR überprüft.

Zusammenfassend deuten alle durchgeführten Komplementationstests darauf hin, dass *AtMTP2* die zelluläre Entgiftung von Zn, Co und Fe vermitteln kann, wobei der Effekt für Zn am stärksten ist. Ein Hinweis, ob die Entgiftung durch Export der Metalle aus der Zelle oder durch Transport ins Endomembransystem vermittelt wird, konnte durch diese Experimente nicht erhalten werden.

4.2.2 Lokalisation und Zeitverlauf der Transkription von *AtMTP2* in der Pflanze - *pMTP2::GUS*-Analysen

Erste Experimente zur Transkriptionsanalyse von *AtMTP2* wurden in der T₂-Generation transgener *A. thaliana*-Col-0-Pflanzen durchgeführt, die aufgrund einer T-DNA-Insertion das Reporterprotein GUS unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors exprimieren. Die Segregationsanalysen wurden auf Grundlage der Kanamycin-Resistenz durchgeführt, die durch das *NPTII*-Gen der T-DNA-Insertion vermittelt wird. Am 5'-Terminus des GUS-Reportergens befindet sich ein Teil des ORF von *AtMTP2*, der die ersten zwei der insgesamt sechs Transmembranhelices kodiert. Der Assay wurde in den ersten drei Wochen nach Aussaat auf ½-konzentriertem MS-Agarmedium alle zwei Tage mit je fünf Pflanzen von neun 3:1-segregierenden Linien durchgeführt. Die Pflanzen wurden nach drei

Wochen auf Erde umgesetzt und GUS-Färbung von allen überirdischen Pflanzenteilen durchgeführt, nachdem Blüten und die ersten Schoten entwickelt waren. Zu keinem Zeitpunkt konnte Färbung in irgendeinem Gewebe beobachtet werden. Daten von Affymetrix GeneChip[®]-Experimenten zeigten zu diesem Zeitpunkt, dass die Transkription von *AtMTP2* bei Zn-Mangel in der Wurzel sehr stark hochreguliert wird.³ Die neun Linien wurden in die T₃-Generation propagiert, in der durch Segregationsanalysen acht unabhängige Linien positiv auf Homozygotie getestet wurden. Tatsächlich wurde bei all diesen Linien nach Keimung auf Platten, die HOAG-Medium ohne zugegebenes Zn enthielten, nach einigen Tagen in der meristematischen Zone der primären Wurzelspitze auf GUS-Aktivität zurückzuführende Blaufärbung nach Inkubation mit dem Substrat X-Gluc beobachtet (**Abbildung 4.6**). Bei älteren Pflanzen war stattdessen starke Färbung in derselben Zone von Seitenwurzeln zu beobachten, die in einigen Fällen auch Färbung in der Differenzierungszone der Wurzel zeigten (zu den Wurzelzonen s. **Abbildung 4.10**). Obwohl diese Färbung bei allen acht unabhängigen Linien beobachtet wurde,

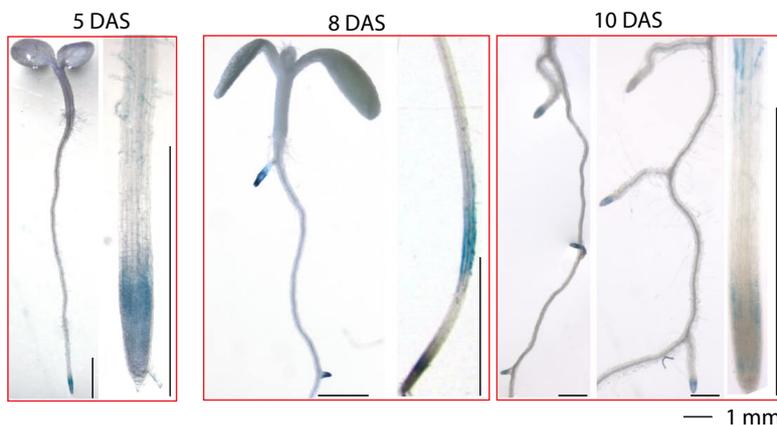


Abb. 4.6: Analyse von *pAtMTP2::GUS*-Linien nach Anzucht auf Agarosemedien. Sterilisierte Samen der T₃-Generation von acht unabhängigen homozygoten Linien wurden auf HOAG –Zn-Agarosemedium ausplattiert. Zum Medium wurde 0,5 % (m/V) Saccharose zugegeben. GUS-Assays wurden nach Ernte der Pflanzen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Keimung (Tage nach Aussaat (DAS)) durchgeführt. Die gezeigte Färbung ist repräsentativ für alle acht unabhängigen Linien.

gab es Ausnahmen: Bei jeder Linie gab es etliche Pflanzen, die gar keine Färbung aufwiesen. Zudem waren häufig nicht alle sekundären Wurzelspitzen einer Pflanze gefärbt. Die zwei Zonen der Wurzelspitze – die meristematische und die Differenzierungszone – waren nicht immer gleichzeitig gefärbt. Es wurde vermutet, dass entweder lokale Zn-Kontaminationen die Expression verhindern oder nicht alle Wurzelspitzen Kontakt zum Medium hatten und eventuell Faktoren zur Transkription von *AtMTP2* notwendig sind, die Kontakt zum Medium signalisieren. Daher wurden Pflanzen von allen acht Linien im hydroponischen System angezogen, die im weiteren Verlauf des Experiments Zn-defizient gemacht wurden. Drei Wochen nach dem Beginn des Zn-Entzuges wurde ausschließlich bei der Linie *pMTP2::GUS-1-1* die schon auf Agarosemedium beobachtete Färbung in der meristematischen und der Differenzierungszone von Seitenwurzeln beobachtet (**Abbildung 4.7 B–D**). Wie zuvor auf Agarosemedien waren auch bei diesen hydroponisch angezogenen Pflanzen nicht alle Wurzelspitzen einer Pflanze gefärbt. Zudem zeigten die gefärbten Wurzelspitzen nicht immer in beiden Zonen gleichzeitig

³Ina N. Talke, persönliche Kommunikation

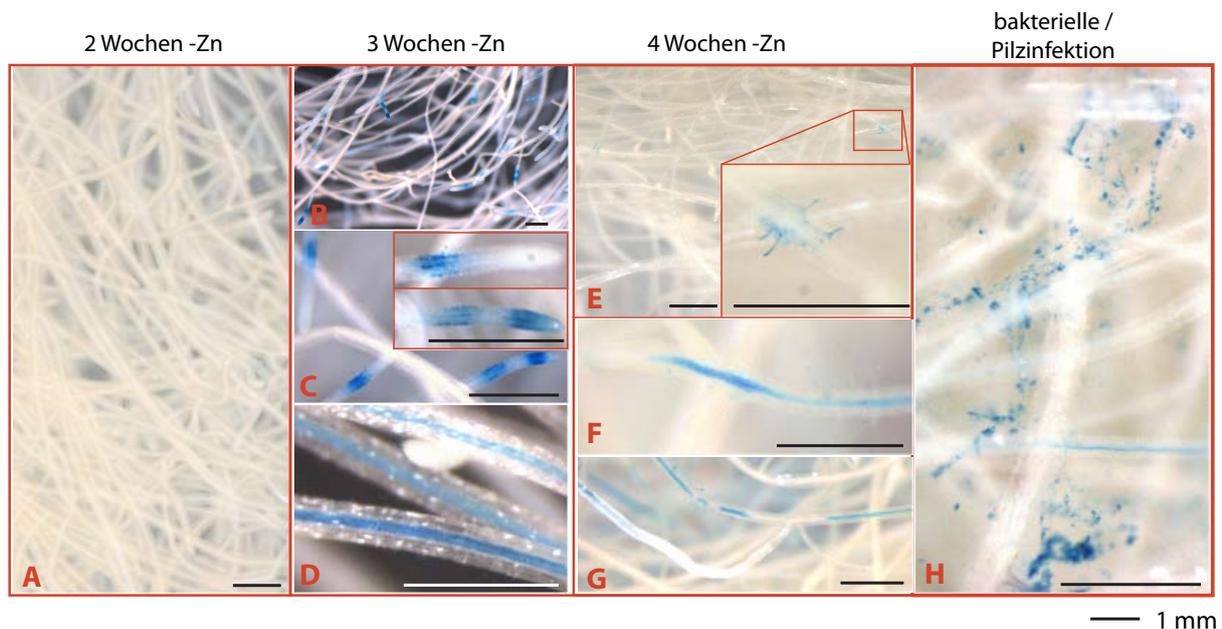


Abb. 4.7: Analyse von *pAtMTP2::GUS*-Linien in Hydrokultur. Hydrokultur wurde mit Pflanzen der T_3 -Generation von acht unabhängigen homozygoten Linien durchgeführt. Nach zwei Wochen wurde Medium ohne zugegebenes Zn verwendet, das wöchentlich ausgetauscht wurde. GUS-Assays wurden wöchentlich mit je drei Pflanzen pro Linie durchgeführt. Drei Wochen nach Zn-Entzug wurde die dargestellte Färbung beobachtet. Die Färbung in den Wurzelspitzen wurde nur bei einer Linie beobachtet. Die Färbung im Leitgewebe wird für ein Artefakt gehalten, da sie auch unter Kontrollbedingungen ($5 \mu\text{M Zn}$) und bei Wildtyppflanzen ab der dritten Woche beobachtet wurde.

Färbung: Bei einigen der gefärbten Wurzelspitzen trat die Färbung nur in der Differenzierungszone auf. Diese Zone ist charakterisiert durch das Erscheinen von Wurzelhaaren und der beginnenden Lignifizierung des Xylems. Die in dieser Zone befindlichen Wurzelhaare waren ebenfalls gefärbt. Ebenfalls in der Abbildung ist die Beobachtung dargestellt, dass vier Wochen nach Zn-Entzug die Färbung der Wurzelspitzen nicht mehr beobachtet wurde bzw. nur bei zwei Wurzelspitzen einer Pflanze der Linie *pMTP2::GUS-1-1* sehr schwache Blaufärbung in der Differenzierungszone auftrat. Auch wenn die Färbung der Wurzelspitzen nur bei einer Linie nach Anzucht im hydroponischen System – drei Wochen nach Zn-Entzug – beobachtet wurde, wird *nicht* angenommen, dass es sich um ein unrepräsentatives Artefakt handelt: Dagegen spricht, dass die Färbung auf Agarosemedien bei allen acht Linien beobachtet wurde – auch wenn nicht bei allen Pflanzen pro Linie. Zudem bestätigte das Muster der Färbung im hydroponischen System die vorherigen Beobachtungen sehr deutlich. Um ein Artefakt scheint es sich allerdings bei der Färbung im Leitgewebe zu handeln, die ab der dritten Woche nach Weglassen von Zn im Wachstumsmedium bei $\approx 60\%$ aller Pflanzen beobachtet wurde. Für die Annahme, dass es sich hierbei um ein Artefakt handelt, sprechen drei Gründe: Zum ersten wurde diese Art der Färbung auch beim Wildtyp beobachtet. Zweitens erscheint es unwahrscheinlich, dass die Promotoraktivität von *pMTP2* das beobachtete Muster der Leitgewebe-Färbung bedingt: So war in manchen Fällen das Leitgewebe nicht durchgängig gefärbt, sondern unterbrochen von Zonen ohne jegliche Färbung. Zu-

dem wurde bei Pflanzen, welche diese Färbung aufwiesen, häufig weitere Färbung beobachtet, die klar auf bakterielle oder Pilzinfektion zurückgeht (*H* in **Abbildung 4.7**). Drittens wurde Färbung im Leitgewebe auch beim Col-0-Wildtyp unter Kontrollbedingungen (5 μM Zn) beobachtet.

Es wurde angenommen, dass auch bei dem Experiment im hydroponischen System Zn-Kontamination vorlag. Bei der Anzucht von Pflanzen im hydroponischen System werden häufiger Unterschiede im Wachstum innerhalb eines Genotyps beobachtet, die eindeutig auf die verwendeten Kunststoffbehälter zurückgehen, in denen die Pflanzen schwimmen. Dies kann zum einen mit der vorherigen Verwendung des Gefäßes zusammenhängen: Es ist vorstellbar, dass bei hohen Zn-Konzentrationen im Medium Zn im Laufe der viele Wochen dauernden Experimente in die Matrix des Kunststoffs hineindiffundiert, das selbst durch mehrere Tage Inkubation in Säure nicht herausgelöst werden kann. Andererseits ist bekannt, dass teilweise bei der PVC-Verarbeitung Zn-haltige Konditionierer und Härter eingesetzt werden.⁴ Im Zusammenhang mit der Charakterisierung von *AtMTP2-Knockout*-Pflanzen stellte sich tatsächlich heraus, dass im verwendeten HOAG-Medium Zn-Kontaminationen vorlagen. Bei einem weiteren Experiment zur vergleichenden GUS-Färbung von *AtMTP1*, -2 und -3 nach Anzucht auf Agarosemedium (**Abschnitt 4.2.3**) wurden die in **Abschnitt 4.2.6** erörterten Maßnahmen zur Minimierung der Zn-Kontamination ergriffen. Dabei sei vorweggenommen, dass auch hier Kontaminationen im Bereich von 22 bis 200 μM Zn im Agarosemedium der Wachstumsplatten vorlagen. Auf einer Agaroseplatte mit ≈ 40 nM waren über 90 % aller Wurzelspitzen gefärbt, wohingegen bei 200 nM Zn nur ≈ 10 % aller Wurzelspitzen Färbung zeigten. Da das HOAG-Medium nach der Herstellung frei von detektierbarem Zn war, wurde angenommen, dass Zn aus dem Material der verwendeten Platten diffundiert (**Tabelle 4.2, S. 84**). Im HOAG-Medium von zwei Wachstumsgefäßen, die im hydroponischen System eingesetzt werden, wurden ≈ 30 nM Zn detektiert. Die oben aufgestellte These, dass mangelnder Kontakt zum Agarosemedium die fehlende Färbung einiger Wurzelspitzen verursacht, konnte nicht bestätigt werden.

In der Entwicklungsserie (*Developmental Series*) von ATGENEXPRESS⁵ (Zimmermann *et al.*, 2004) wurde für *AtMTP2* eine deutliche erhöhte Expression in späten Stadien der Samenreifung und in reifen Pollen angezeigt. Bei daraufhin durchgeführten GUS-Färbungen mit Samen der Stadien *late torpedo* bis *early green cotyledons* sowie mit Blüten und Pollen wurde keine GUS-Aktivität in diesen Geweben beobachtet. Durch Mikroskopie wurde sichergestellt, dass die im Experiment analysierten Samen tatsächlich im richtigen Entwicklungsstadium waren. Es wird angenommen, dass die in ATGENEXPRESS angezeigte erhöhte Expression auf Kreuz-Hybridisierung mit anderen MTPs zurückgehen könnte, da die *Massively Parallel Signature Sequencing* (MPSS)-Datenbank⁶ (Brenner *et al.*, 2000) nur erhöhte Transkriptmengen in Wurzeln bestätigt. Für Pollen wurden in den MPSS-Daten keine

⁴Henk Schat, persönl. Kommunikation

⁵<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/botanik/mcb/AFGN/>

⁶<http://mpss.udel.edu/at/>

erhöhten Transkriptmengen gefunden, wohingegen für Samen der letzten Entwicklungsstadien keine Aussage getroffen werden kann, da für dieses Stadien keine Daten vorliegen. Bei MPSS wird die Transkriptmenge eines Gens aufgrund der Häufigkeit von Signatursequenzen bestimmt, die für dieses Gen spezifisch sind.

4.2.3 Vergleichende Promotor::*GUS*-Analysen von *AtMTP1*, -2 und -3

Die CDF-Familie umfasst in *A. thaliana* 12 Mitglieder, wovon sich *AtMTP1*, -2, -3, -5 und -12 im phylogenetischen Stammbaum im Zweig der mutmaßlichen Zn-Transporter befinden (**Abbildung 1.1**). Für *AtMTP1* und -3 wurde bereits der Nachweis des Zn-Transports erbracht (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Arrivault *et al.*, 2006). Für *PtdMTP1* aus Pappel wurde auch Zn-Transport nachgewiesen (Blaudez *et al.*, 2003), wie auch für viele nicht pflanzliche Mitglieder der CDF-Familie in diesem Zweig, z. B. *HsZnT1* (Palmiter und Findley, 1995), die zuvor erwähnten Mitglieder *ScMsc2* (Li und Kaplan, 2001), *ScZrc1* und *ScCot1* (Li und Kaplan, 1998). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwiefern die pflanzlichen CDFs redundante Funktionalität haben oder unter unterschiedlichen Bedingungen eine Rolle bei der Metallhomöostase spielen. Daher wurde in einem vergleichenden Experiment die Lokalisierung der Transkription von *AtMTP1*, -2 und -3 in der Wurzel mittels Promotor::*GUS*-Fusionen analysiert. Es wurde je eine charakteristische Linie ausgewählt und sterilisierte Samen auf HOAG-Agarosemedium plattiert, das 0, 5 und 30 μM Zn enthielt. Nach histochemischer Färbung auf GUS-Aktivität mit X-Gluc als Substrat acht und zehn Tage nach Aussaat wurde für *pMTP1::GUS*-Pflanzen bei allen Zn-Konzentrationen Blaufärbung in allen Wurzelspitzen beobachtet (**Abbildung 4.8**). Dahingegen war GUS-Aktivität für *pMTP3::GUS* nur bei 30 μM Zn zu beobachten und für *pMTP2::GUS* nur bei 0 μM Zn. Im Fall von *pMTP3::GUS* war acht Tage nach Aussaat oberhalb der Verlängerungszone der Wurzel (distal der Wurzelspitze) in der gesamten Wurzel Färbung zu beobachten (zu den Wurzelzonen s. **Abbildung 4.10**). Zwei Tage später wurde dieses Färbungsmuster in allen Seitenwurzeln der *pMTP3::GUS*-Linie beobachtet. Die Färbung in der Hauptwurzel war zu diesem Zeitpunkt deutlich auf die Wurzelhaarzone beschränkt. Für *pMTP2::GUS* wurde die in **Abschnitt 4.2.2** beschriebene Lokalisation der GUS-Aktivität festgestellt. In diesem Abschnitt wurde auch erwähnt, dass auf Agaroseplatten mit niedriger Zn-Kontamination ein prozentual höherer Anteil der Wurzelspitzen gefärbt war, als auf Platten mit höherer Zn-Kontamination. Das Zn-Kontaminationsproblem wird in **Abschnitt 4.2.6** erörtert, ebenso wie die Maßnahmen zur Reduktion der Kontamination für das hier durchgeführte Experiment. Detaillierte Analyse der Lokalisation der GUS-Aktivität (**Abbildung 4.9**) zeigt, dass *pMTP1::GUS* und *pMTP2::GUS* ähnliche Transkriptionsmuster aufweisen: Im Fall von *pMTP1::GUS* ist starke GUS-Aktivität in der meristematischen Zone zu sehen, die kontinuierlich über die Elongations- und Differenzierungszone bis hin zur Reifungszone geringer wird. Bei der *AtMTP2*-Linie ist die Elongationszone frei von jeglicher GUS-Aktivität. Wur-

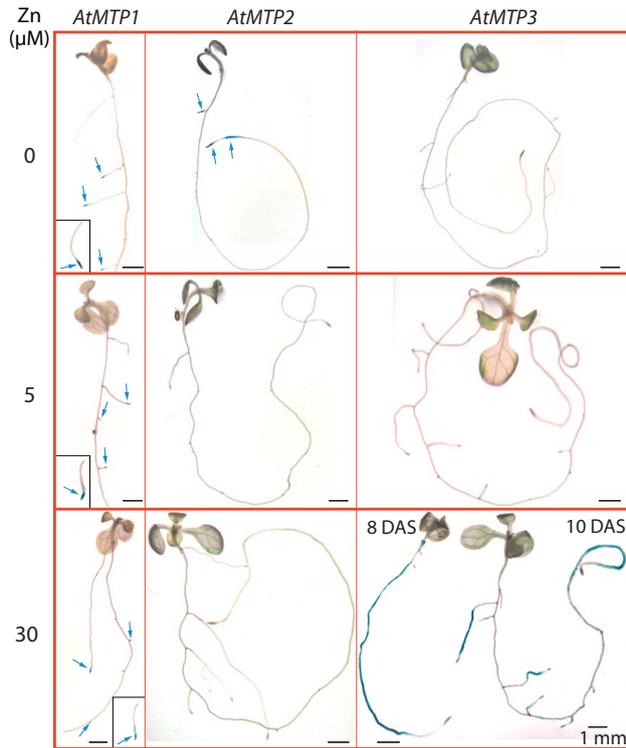
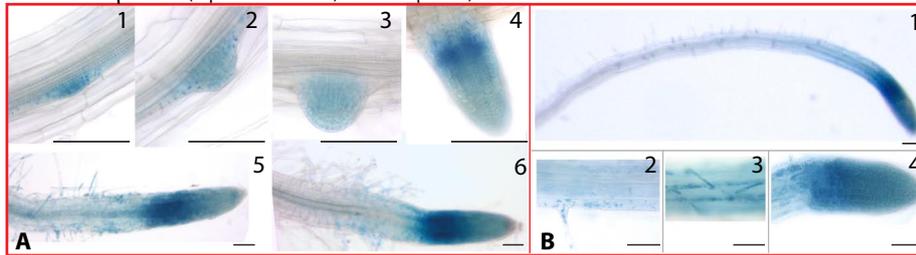
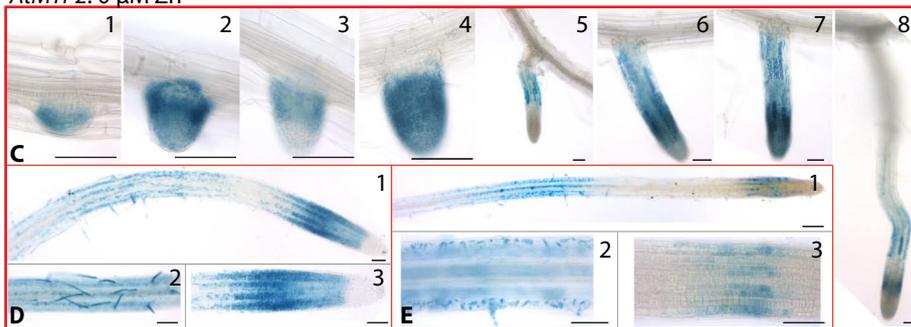


Abb. 4.8: Zn-Abhängigkeit der Promotoraktivität von *AtMTP1*, -2 und -3 in Keimlingen. Samen von transgenen Col-0-Linien, welche homozygot für eine T-DNA-Insertion zur Expression von *pMTP2::GUS* (Linie 1-1), *pMTP1::GUS* (Linie 18-1 von Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005) bzw. *pMTP3::GUS* (Linie 1.1 von Arrivault *et al.*, 2006) sind, wurden sterilisiert und auf 0,25×HOAG-Medium plattiert, welches 0,5 % (m/V) Saccharose, 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose sowie 0-, 5- bzw. 30 µM ZnSO₄ enthält. Histochemische Färbung auf GUS-Aktivität wurde acht und zehn Tage nach Aussaat durchgeführt. Die in **ABBILDUNG 4.9** detailliert dargestellte Lokalisation GUS-Aktivität wurde für MTP1 und -2 mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Für *pMTP1::GUS*-Pflanzen wurde das untere Drittel der Wurzel bis zur Primärwurzelspitze (eingesetzte Kästchen) nicht dargestellt.

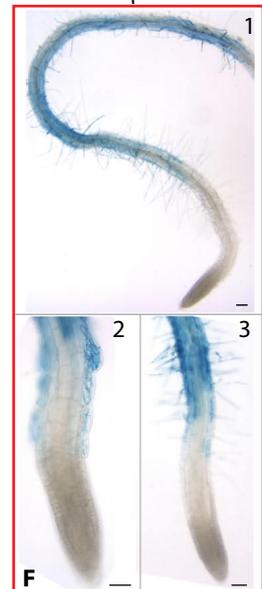
AtMTP1: 0 µM Zn (repräsentativ für 0, 5 und 30 µM Zn)



AtMTP2: 0 µM Zn



AtMTP3: 30µM Zn



— 100 µm

Abb. 4.9: Lokalisierung der Promotoraktivität von *AtMTP1*, -2 und -3 in Keimlingen (zehn Tage nach Aussaat). Zu den Linien und der Anzucht der Pflanzen siehe **ABBILDUNG 4.8**. **A, B** *pMTP1::GUS*-Linie bei 0, 5 und 30 µM Zn, **C–E** *pMTP2::GUS*-Linie bei 0 µM Zn, **F** *pMTP3::GUS*-Linie bei 30 µM Zn. **A** Entwicklungsstadien von Seitenwurzeln der *pMTP1::GUS*-Linie **B** Apex der Primärwurzel der *pMTP1::GUS*-Linie mit Detailvergrößerungen, **C** Entwicklungsstadien von Seitenwurzeln der *pMTP2::GUS*-Linie, **D(E)** Apex einer Seitenwurzel (Primärwurzel) der *pMTP2::GUS*-Linie mit Detailvergrößerungen, **F** Apex der Primärwurzel der *pMTP3::GUS*-Linie mit Detailvergrößerungen.

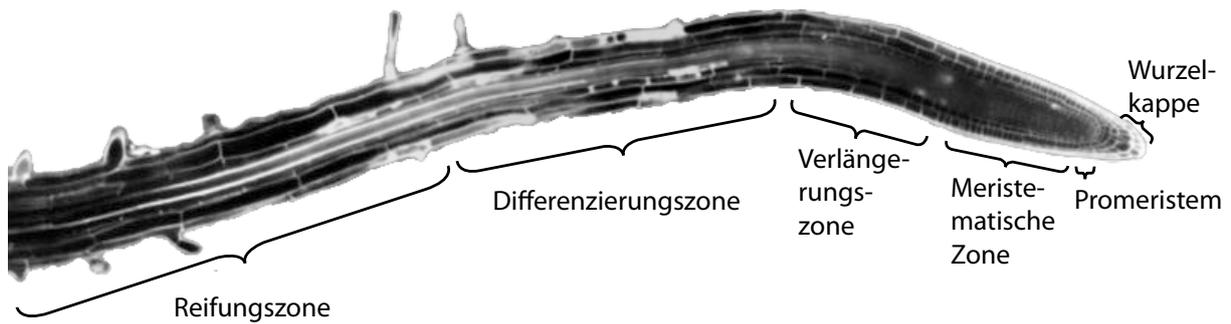


Abb. 4.10: Anatomie der *Arabidopsis*-Wurzel. Übernommen von AREX (<http://www.arex.org>)

zelhaare der Differenzierungszone sind immer gefärbt. Im Zuge der Entwicklung einer Seitenwurzel sind *pMTP1* und *pMTP2* zu den gleichen Zeitpunkten aktiv. Bei der Lokalisierung der GUS-Aktivität treten allerdings einige Unterschiede auf: So fällt bei einigen *pMTP2::GUS*-Pflanzen auf, dass im Gegensatz zu *pMTP1::GUS* in der Zone der Wurzelkappe keine GUS-Aktivität vorliegt (vergl. *A* mit *D* in **Abbildung 4.9**). Auch in der meristematischen Zone, die durch isodiametrische Zellen charakterisiert ist (Scheres *et al.*, 2002), wird bei einigen Seitenwurzeln keine GUS-Aktivität beobachtet (*C* in **Abbildung 4.7**, *C5* in **Abbildung 4.9**). Wurzelhaar-tragende epidermale Zellen (Trichoblasten) sind bei *pMTP2::GUS* deutlich stärker gefärbt, als die dazwischen liegenden epidermalen Zellen ohne Wurzelhaare (Atrichoblasten). Im Fall relativ schwacher Färbung ist zu erkennen, dass *ausschließlich* Trichoblasten gefärbt sind (*E* in **Abbildung 4.9**). Der Kortex der *Arabidopsis*-Wurzel besteht aus acht Zellen, wobei sich Trichoblasten immer über antiklinale Zellwänden kortikaler Zellen entwickeln (Scheres *et al.*, 2002). Stärkere Färbung der Trichoblasten wurde auch bei *pMTP1::GUS* beobachtet. So deutlich wie in *B* in **Abbildung 4.9** wurde dies allerdings nur in sehr wenigen Fällen beobachtet. Die Färbung der Wurzelhaare wurde durch Desbrosses-Fonrouge *et al.* (2005) nicht beschrieben. Sie trat im allgemeinen nur sehr unregelmäßig auf und betraf in diesem Falle nur einige wenige Wurzelhaare der beginnenden Differenzierungszone. Im direkten Vergleich von *A* und *F* in **Abbildung 4.9** ist zu erkennen, dass die Färbung der Wurzelhaare bei *pMTP1::GUS* vergleichsweise schwach war. Zudem waren überwiegend kurze Wurzelhaare gefärbt. Aufgrund des unregelmäßigen Auftretens wird angenommen, dass der Farbstoff aus den Wurzelhaar-tragenden epidermalen Zellen durch mechanischen Einfluss während der Färbeprozedur überwiegend in kurze Wurzelhaare gelangen könnte.

Um die in den Abbildungen gezeigten Intensitäten der Blaufärbung zu erzielen, mussten Pflanzen der *pGUS::MTP2*-Linien über Nacht mit dem Substrat X-Gluc inkubiert werden. Dahingegen wurden vergleichbare Intensitäten bei der *pMTP1::GUS*- und der *pMTP3::GUS*-Linie bereits nach rund 30 min Inkubation mit X-Gluc erzielt. Um eine genauere Aussage über die relative GUS-Aktivität zu treffen, wurden Wurzel-Proteinextrakte von Keimlingen der *pMTP1(2,3)::GUS*-Linien analysiert. Die GUS-Aktivität wurde anhand der Umsetzung von MUG zu dem fluoreszierenden Produkt MU

fluorimetrisch bestimmt (Abbildung 4.11). Hierbei bestätigten sich die vorherigen Beobachtungen:

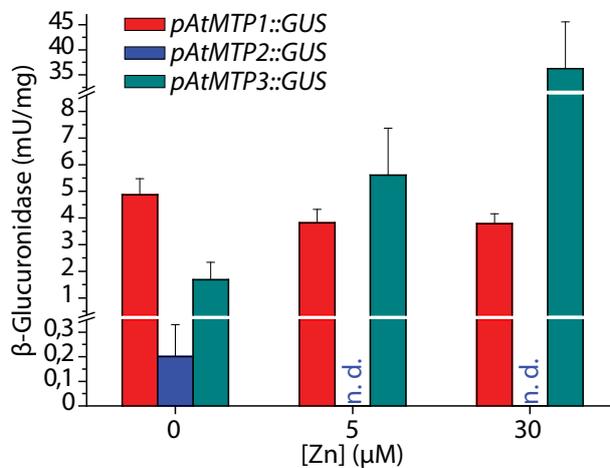


Abb. 4.11: Promotoraktivität von *AtMTP1*, -2 und -3 in Keimlingen: MUG-Assay. Die angegebenen Zn-Konzentrationen wurden zu 1/2-konzentriertem MS-Agarosemedium gegeben und auf jeweils drei replikativen Platten je eine charakteristische Linie sowie der Wildtyp (Col-0) angezogen. Vierzehn Tage nach Aussaat wurden für jede Linie die Wurzeln der Keimlinge einer Platte (≈ 15) gepoolt und aus dem homogenisierten Material Proteine extrahiert. Es wurde die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt (Bradford, 1976) und die GUS-Aktivität fluorimetrisch quantifiziert. Die spezifische Aktivität wurde abzüglich der Hintergrundaktivität der Col-0-Pools in mU (IUPAC, $1\text{U} = 1\mu\text{mol MU} \cdot \text{min}^{-1}$) pro mg Gesamtprotein angegeben (n. d. – nicht detektierbar).

Die *pMTP1::GUS*-Linie zeigte bei allen Zn-Konzentrationen annähernd gleiche GUS-Aktivität, wohingegen die *pMTP2::GUS*-Linie nur bei $0\mu\text{M}$ Zn GUS-Aktivität aufwies. Dass hierbei nur $\approx 1/20$ der Aktivität der *pMTP1::GUS*-Linie gemessen wurde, ist in Übereinstimmung mit der oben erwähnten Tatsache, dass die Pflanzen der *pMTP2::GUS*-Linien für die gleiche Intensität der Blaufärbung rund 20–30 mal länger mit X-Gluc inkubiert werden mussten als *pMTP1::GUS*-Pflanzen. Für die auf $30\mu\text{M}$ Zn gewachsenen *pMTP3::GUS*-Pflanzen wurde sehr starke GUS-Aktivität gemessen. Bei $0\mu\text{M}$ Zn wurde nur sehr geringe Aktivität gemessen. Diese war allerdings nominell höher als für *pMTP2::GUS*. Dies könnte auf tatsächlich unterschiedliche Transkriptmengen, unterschiedliche Transkript-/Proteininstabilitäten sowie darauf zurückgehen, dass der Wurzelbereich, in dem *AtMTP3* exprimiert wird, rund zehnmal größer als der Bereich in der Wurzelspitze ist, in dem *AtMTP2* exprimiert wird. Bei $0\mu\text{M}$ Zn könnte somit selbst sehr niedrige Hintergrundexpression von GUS in der Linie *pMTP3::GUS* zu einer höheren GUS-Aktivität führen als im Fall der induzierten GUS-Expression bei *pMTP2::GUS*-Pflanzen. Für die MTP3-Linie wurde im Vergleich zur hohen Aktivität bei $30\mu\text{M}$ Zn nur $\approx 1/20$ der Aktivität bei $0\mu\text{M}$ Zn und $\approx 1/5$ bei $5\mu\text{M}$ Zn gemessen.

4.2.4 Zelluläre Lokalisation des Proteins

Durch computergestützte Topologievorhersagen ist bekannt, dass *AtMTP2*, wie die meisten Mitglieder der CDF-Familie, sehr wahrscheinlich sechs Transmembranhelices aufweist (Abbildung 4.3) und folglich in einer Membran der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein muss. Es existieren etliche computergestützte Ansätze, die Lokalisierung eines Proteins durch Sequenzanalyse vorherzusagen, aber meistens bieten diese Vorhersagen nur einen ersten Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen. Bei *AtMTP2* tritt direkt nach dem Start-Methionin ein XXRR-Aminosäuremotiv auf (Sequenz in Anhang A.1.1), welches häufig bei ER-residenten Membranproteinen gefunden wird: Ähnlich wie lu-

menale ER-Proteine, die das Tetrapeptid K(H)DEL als ER-*Retention Signal* im C-Terminus haben, verfügen viele ER-Membranproteine über ein solches XXRR-Motiv im N-Terminus oder ein KKXX- bzw KXKXX-Motiv im C-Terminus (Teasdale und Jackson, 1996). Allerdings ist für eine Vorhersage der Lokalisation das Auftreten dieser Motive weder notwendig noch hinreichend. Zudem muss das XXRR-Motiv innerhalb der ersten Aminosäuren auftreten, um ER-Lokalisierung als alleinige Determinante zu bewirken. Ein ähnliches Motiv wird bei keinem der anderen zwölf MTPs von *A. thaliana* gefunden.

Für die Analyse der Lokalisation in der Zelle, wurden Konstrukte hergestellt, die chimäre Fusionen von *AtMTP2* mit EGFP kodieren. Für Analysen in Hefe wurde *AtMTP2* in den Vektor pUG35GW kloniert (*pMTP2::MTP2:EGFP*). Auch für Analysen in Protoplasten, die aus Zellen von *A. thaliana*-Zellkulturen hergestellt wurden, erfolgte die Fusion von EGFP an den C-Terminus von *AtMTP2* durch Klonierung von *AtMTP2* in den Vektor pK7WGF2. Nach Transformation von Hefe bzw. Protoplasten wurde die Lokalisierung mit einem *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) untersucht (Abbildung 4.12). In beiden Fällen wurden netzwerkartige Strukturen beobachtet, die charakteris-

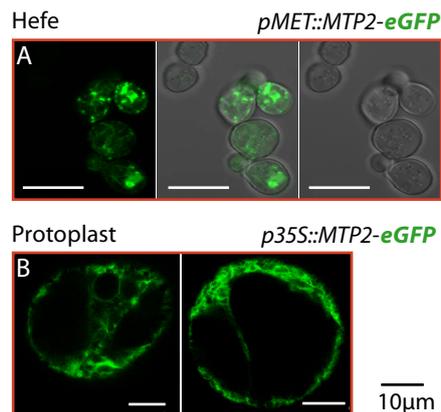


Abb. 4.12: Lokalisierung von *AtMTP2* als chimäres EGFP-Fusionsprotein in Hefe und in *A. thaliana* Protoplasten. EGFP-Fluoreszenz ist grün dargestellt. *A* Hefezellen der Mutante *zrc1*, die *AtMTP2-EGFP* exprimieren. Das Zytoplasma wird durchzogen von einem für das ER typischen Netzwerk. Die hellen Strukturen von $\approx 1 \mu\text{m}$ Durchmesser könnten Golgi-Stapel oder *inclusion bodies* sein (siehe Text). *B* Transiente Expression von *AtMTP2-EGFP* in *A. thaliana*-Protoplasten, die aus Zellkulturen hergestellt wurden (24 h nach der Transformation). Für das ER typische Netzwerkstrukturen werden auch hier beobachtet. Die Vakuole wird in der rechten Abbildung von einem zytoplasmatischen Strang durchzogen.

tisch für das ER sind. In Hefe wurden zusätzlich Strukturen mit einer Größe von $\approx 1 \mu\text{m}$ gefunden, die entweder auf Golgi-Stapel zurückgehen oder *Inclusion bodies*. Letztere entstehen aufgrund der Überexpression von Proteinen mit hydrophober Oberfläche häufig in *E. coli* und Hefe. Da diese Strukturen nur bei starker Expression des EGFP-Fusionsprotein beobachtet wurden (obere zwei Zellen in *A*, vergl. mit Abbildung 1 b in Giorgini *et al.*, 2005), handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich tatsächlich um solche *Inclusion bodies* – also Aggregate des überexprimierten *AtMTP2*.

Die Lokalisation von *AtMTP2* wurde zunächst in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen durchgeführt, die N- und C-terminale Fusionen von EGFP an *AtMTP2* unter der Kontrolle des *p35S*-Promotors exprimierten. Dazu wurde *AtMTP2* in die Vektoren pK7FWG2 (*p35S::EGFP:MTP2*) und pK7WGF2 (*p35S::MTP2:EGFP*) kloniert. Keimlinge der T_2 -Generation transgener Pflanzen wurden auf $\frac{1}{2}$ -konzentriertem MS-Agarosemedium angezogen, welches kein Antibiotika zur Selektion transgener Pflanzen enthält. Acht Tage nach Aussaat wurde Konfokalmikroskopie durchgeführt. Wie

in *A–F* in **Abbildung 4.13** zu erkennen ist, kann im Fall der N-terminalen Fusion von EGFP an *AtMTP2* keine klare Aussage in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation getroffen werden. In vielen Fällen ist EGFP-Fluoreszenz prominent in der Tonoplastenmembran bzw. den Membranen von Prävakuolen, ist aber auch im zytoplasmatischen Raum netzwerkartig zu erkennen. Zu erkennen sind zum Teil sehr komplexe Strukturen des Tonoplast, die bereits in der Literatur beschrieben wurden (Uemura *et al.*, 2002). Sie entstehen durch Ablösung eines Teils der Hauptvakuole, die daraufhin den abgelösten Teil wieder umhüllt ohne mit ihm zu fusionieren sowie durch Einstülpungen und Faltungen des Tonoplast. Weitere Zweifel an einer ausschließlich vakuolären Lokalisation ruft die Beobachtung hervor, dass in den meisten Fällen der Nukleus geschlossen umgeben ist von einem fluoreszierenden Ring, der sehr wahrscheinlich ER ist. Die in *E* sehr deutlich erkennbaren punktförmigen Strukturen gehen wahrscheinlich nicht auf Golgi-Stapel zurück: Strukturen dieser Art werden häufig in *A. thaliana* beobachtet und werden als *ER Körper* bzw. *Fusiform* bezeichnet (Matsushima *et al.*, 2003; Hawes *et al.*, 2001). Diese Strukturen mit einem Durchmesser von 0,5 μM können eine Länge von bis zu 5 μM erreichen. Im Fall der C-terminalen Fusion von EGFP an *AtMTP2* wurde ausschließlich die schon in Protoplasten beobachtete Netzwerkstruktur des ER gefunden.

Um neben der zellulären Lokalisation auch die gewebespezifische Lokalisation zu analysieren, wurden Fusionen von *AtMTP2* mit EGFP hergestellt, die unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors exprimiert werden. Bei Verwendung des nativen Promotors wird zudem die Gefahr fehlerhafter Lokalisierung reduziert. Sie besteht insbesondere dann bei EGFP-Fusionsproteinen, wenn diese aufgrund des *p35S*-Promotors in Geweben stark überexprimiert werden, in denen das native Protein im Wildtyp nicht exprimiert wird. Für die N-terminale EGFP-Fusion wurde dazu im zuvor klonierten Konstrukt *p35S::EGFP:MTP2* im Vektor pK7FWG2 der *p35S*-Promotor durch 1 277 bp der genomischen *AtMTP2*-Sequenz *upstream* des translationalen Start-Codons ersetzt. Im Fall der C-terminalen Fusion wurde im Konstrukt *p35S::MTP2:EGFP* im Vektor pK7WGF2 die Sequenz *p35S::MTP2* durch die 2 279 bp umfassende genomische Sequenz *pMTP2::MTP2* ersetzt. Aufgrund der in **Abschnitt 4.2.2** und **4.2.3** erörterten Promotor::*GUS*-Analysen ist bekannt, dass *AtMTP2* unter stark Zn-defizienten Bedingungen in Wurzelspitzen exprimiert wird. Für die Selektion von transgenen Pflanzen wird im Fall der beiden hier verwendeten Vektoren Kanamycin eingesetzt. In einem vorläufigen Experiment wurde die Erfahrung gemacht, dass Kanamycin-Selektion und Zn-Defizienz zuviel Stress für einen Keimling darstellen, da kurz nach der Keimung alle Keimlinge ihr Wachstum einstellen. Um trotzdem in einem ersten Experiment die Lokalisierung in der T₁-Generation durchzuführen, wurden Pflanzen auf ½-konzentriertem MS-Agarosemedium, das Kanamycin enthielt, zur Keimung gebracht. Sobald transgene Keimlinge von nicht-transgenen unterschieden werden konnten (drei Tage nach Aussaat), wurden die transgenen Keimlinge auf HOAG-Agarosemedium transferiert, dem kein Zn zugegeben wurde. Tatsächlich wurde sieben Tage nach Transfer (DAT) in einigen Wurzelspitzen Fluoreszenz beobachtet, die der in **Abbildung 4.6, 4.7, 4.8** und **4.9** dargestellten GUS-Aktivität entsprach (**Abbildung**

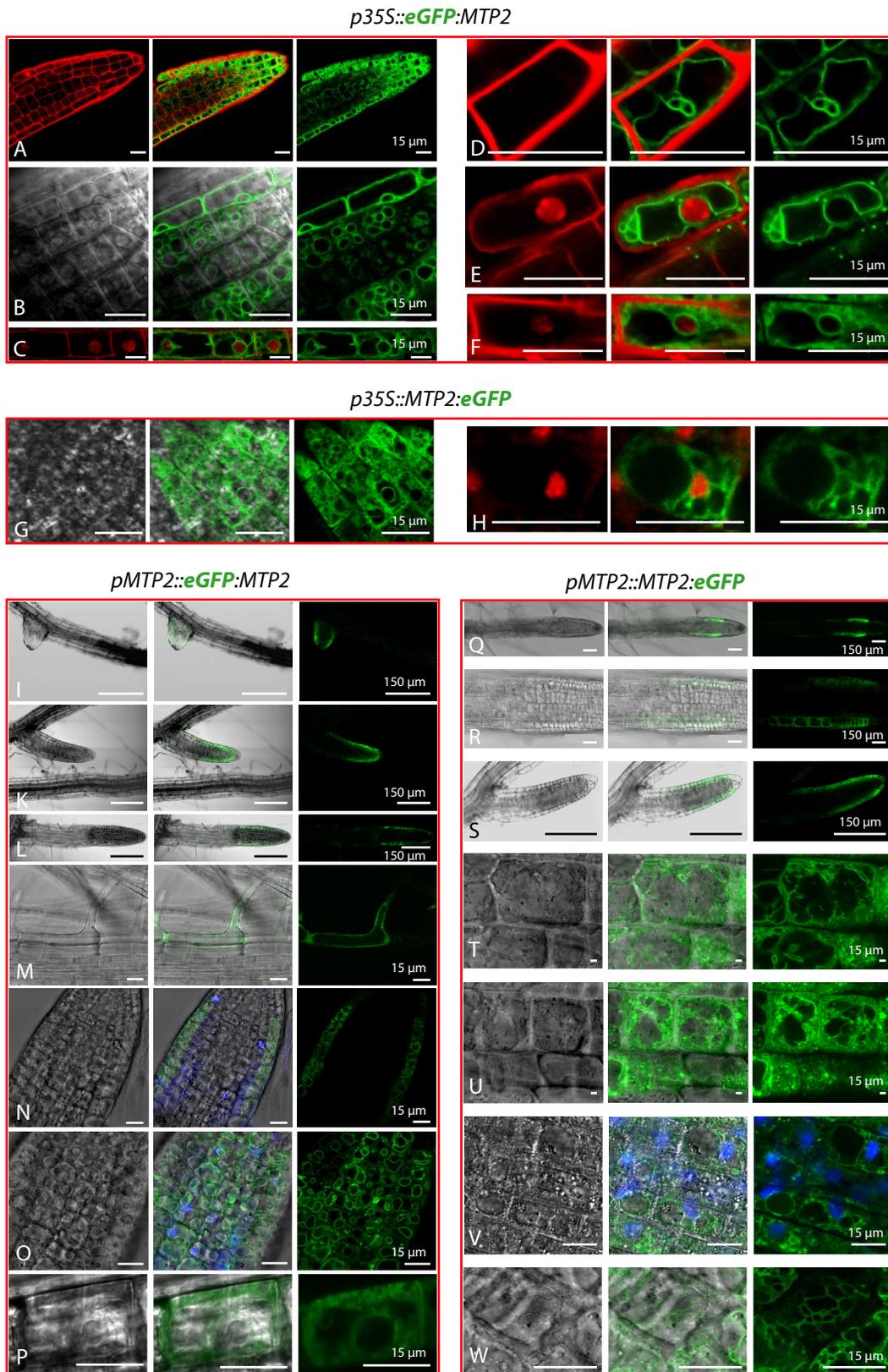


Abb. 4.13: Zelluläre Lokalisierung von *AtMTP2* als chimäres EGFP-Fusionsprotein in stabilen *A. thaliana*-Transformanten. Fortsetzung auf nächster Seite....

Abb. 4.13: Zelluläre Lokalisierung von *AtMTP2* als chimäres EGFP-Fusionsprotein in stabilen *A. thaliana*-Transformanten – Fortsetzung. Transgene *A. thaliana*-Linien tragen T-DNA-Insertionen, die *AtMTP2* als C- und N-terminale Fusion mit EGFP (EGFP-MTP2 bzw. MTP-EGFP) kodieren. Die Expression steht unter Kontrolle des *p35S*-Promotors zur ektoptischen Überexpression (A–H) sowie unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors (I–W). A–H Keimlinge der T₂-Generation wurden auf 1/2-konzentriertem MS-Agarmedium angezogen, das 0,5 % Saccharose und 0,8 % Sigma-Typ-M-Agar enthielt. Konfokalmikroskopie acht Tage nach Aussaat. I–W Keimlinge der T₁-Generation der *pMTP2*-Linien wurden auf demselben Agarosemedium angezogen, das zusätzlich 50 µg · ml⁻¹ Kanamycin zur Selektion von T-DNA-Transformanten enthielt. Um die zur Induktion des *pMTP2*-Promotors nötigen Zn-defizienten Bedingungen zu erzielen (ABSCHNITT 4.2.2 und 4.2.3), wurden Kanamycin resistente Keimlinge drei Tage nach der Keimung auf HOAG-Medium transferiert, welches 0,5 % (m/V) Saccharose, 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose sowie 0 µM Zn enthielt. Dabei wurden die in ABSCHNITT 4.2.6 erörterten Maßnahmen zur Vermeidung von Zn-Kontamination berücksichtigt. Konfokalmikroskopie sieben Tage nach Transfer. A Wurzelspitze, B Meristem/Differenzierungszone, C,F Putative ER-Lokalisierung, D,E Putative vakuoläre Lokalisierung, G,H Meristem/Differenzierungszone, I–L,Q–S Entwicklungsstadien von Wurzelspitzen analog zu ABBILDUNG 4.9, Fluoreszenz nur in der Epidermis, M Wurzelhaar, N,O Fluoreszierende epidermale Zellen im Meristem/Differenzierungszone, putative vakuoläre Lokalisation, P Putative ER-Lokalisation T,U,V,W Putative ER-Lokalisation. EGFP-Fluoreszenz ist grün dargestellt. Gegenfärbungen wurden z. T. mit DAPI (1 µg · ml⁻¹, Zellkerne, blau) und Propidiumjodid (50 µg · ml⁻¹, Zellwände und -kerne, rot) durchgeführt. Propidiumjodid färbt bei niedrigen Konzentrationen (≈1 µg · ml⁻¹) neben Zellwänden nur Zellkerne von geschädigten und toten Zellen, ist bei hohen Konzentrationen aber in der Lage die Zellmembran zu durchdringen.

4.13). In beiden Fällen – der N- und C-terminalen EGFP-Fusion – ist deutlich zu erkennen, dass nur die Epidermis der Wurzelspitzen EGFP-Fluoreszenz aufweist. Die Epidermis umfasst bei *Arabidopsis* nur eine Zellschicht. Wurzelhaare von epidermalen Zellen in der Differenzierungszone exprimierten ebenfalls die Fusionsproteine, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Promotor::*GUS*-Analysen ist. Auf zellulärer Ebene wurden dieselben Beobachtungen wie zuvor bei Pflanzen gemacht, welche die Fusionsproteine unter der Kontrolle des *p35S*-Promotors ektoptisch überexprimierten. Im Fall der N-terminalen Fusion von EGFP an *AtMTP2* zeichneten sich die Vakuolen häufig klar ab. Bei der dreidimensionalen Rekonstruktion solcher Zellen wurden sehr klar die von Uemura *et al.* (2002) beschriebenen komplexen vakuolären Strukturen beobachtet (vergl. Abbildung 3 dort mit **Abbildung 4.14**). Auch wenn in einigen Fällen netzwerkartige Strukturen auszumachen sind (P in **Abbildung 4.13**), spricht dies für hauptsächlich vakuoläre Lokalisation des Proteins. Solch klar umrissene stark fluoreszierende Membranen werden im Fall der C-terminalen Fusion (*pMTP2*::MTP2-EGFP) nicht beobachtet. Ausgeschlossen werden kann auch Lokalisierung in Golgi-Stapeln: hier würde pro Zelle eine große Anzahl fluoreszierender Partikel mit ≈ 1 µm Durchmesser zu beobachten sein. Ebenso kann mitochondriale Lokalisation ausgeschlossen werden. Daher wird angenommen, dass die netzwerkartige Struktur nicht auf eine sehr große Anzahl dicht gepackter Golgi-abgeleiteter Prävakuolen

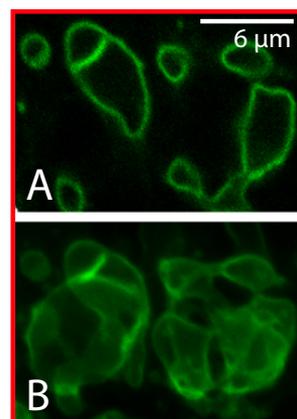


Abb. 4.14: A Vakuolen von zwei epidermalen Wurzelzellen der Differenzierungszone von transgenen *A. thaliana*-Pflanzen (*pMTP2*::EGFP-MTP2). B 3D-Rekonstruktion der zwei komplexen Vakuolen (50 optische Ebenen, 8 µm).

zurückgeht, sondern ER darstellt. Um den Einfluss von Zn auf die zelluläre Lokalisation der chimären Fusionsproteine zu überprüfen, wurden Pflanzen in der T₂-Generation parallel auf HOAG-Medien *mit* und *ohne* zugegebenem Zn angezogen. Vor der Konfokalmikroskopie wurde einigen Zn-defizienten Pflanzen wieder Zn zur Verfügung gestellt, indem sie zwei Stunden in HOAG-Medium + 5 µM gegeben wurden. Dies wurde bisher nur für Pflanzen durchgeführt, welche die chimären Fusionsproteine unter Kontrolle des *p35S*-Promotors exprimierten. Bei der vergleichenden Analyse der verschiedenen behandelten Pflanzen konnte kein Einfluss des Zn auf die Lokalisation festgestellt werden. Für Pflanzen, bei denen die Expression der EGFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors steht, konnte dieses Experiment bisher in der T₁-Generation nicht durchgeführt werden, ist aber für spätere Generationen geplant. Zudem sollte die ER-Lokalisierung in zukünftigen Experimenten experimentell durch Co-Lokalisation mit einem ER-Marker, z. B. einem KDEL-DsRed-Konstrukt, bestätigt werden. Als alternative Methode sollte Konfokalmikroskopie nach *Immunolabeling* von *AtMTP2* in Wurzeln des Wildtyps durchgeführt werden. Hierfür wäre es allerdings zunächst notwendig, einen *AtMTP2*-spezifischen Antikörper zu erzeugen. Wenn dieser Antikörper an *AtMTP2* bindet, kann der gebundene Antikörper mit einem zweiten Fluoreszenz-markierten Antikörper detektiert werden.

4.2.5 Genotypisierung der *A. thaliana mtp2-S3*-Mutante

In der SALK-Kollektion von T-DNA-*Knockout*-Linien (Alonso *et al.*, 2003) befindet sich auch eine *mtp2*-Mutante. Die Insertionsstelle der T-DNA entspricht im Protein der Region direkt nach der letzten der sechs Transmembranhelices, aber vor der putativen Zn-Bindungsstelle im C-Terminus. Daher ist davon auszugehen, dass diese Insertion zu einem funktionellen *Knockout* führt. Samen einer Linie der T₄-Generation der *Knockout*-Mutante SALK 003649 wurden von David Salt⁷ erhalten. Die von dieser Arbeitsgruppe erhaltenen Daten sind in **Abbildung 4.16** dargestellt. Man erkennt, dass in der Linie *mtp2-S3* kein *AtMTP2*-Transkript detektiert wurde. Mittels PCR wurde in der T₄-Generation nachgewiesen, dass die Linie homozygot in Bezug auf die T-DNA-Insertion in *MTP2* ist. Nochmalige Überprüfung in der T₅-Generation innerhalb dieser Arbeit bestätigte dieses Ergebnis (**Abbildung 4.15**). Das mit dem *Left-Border*-Primer LBA1 und dem genspezifischen Primer ZAT2tpX erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 kloniert und nach der Amplifikation in *E. coli* sequenziert. Hiermit wurde bestätigt, dass die T-DNA an Position 766 der *AtMTP2*-Sequenz inseriert ist. Die Revision der in **Abbildung 4.16** unter A dargestellten *Southern Blots* zeigt, dass zumindest zwei T-DNA-Insertionen im *AtMTP2*-Locus vorliegen: Nur wenn die *Left Border* der T-DNA an beiden Seiten der Insertionsstelle vorliegen, können bei den durchgeführten Verdauen der gDNA mit Restriktionsenzymen Banden entstehen, die recht genau den beobachteten Banden entsprechen. Die Banden, die durch die verwendeten Restriktionsenzyme aufgrund von Erkennungssequenzen in der T-DNA und der ge-

⁷Purdue University, Indiana, USA

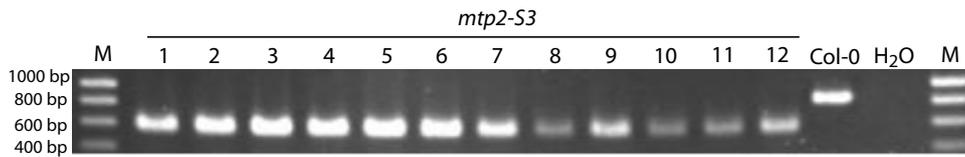


Abb. 4.15: Test auf Homozygotie der T-DNA-Mutante *mtp2-S3*. Nachdem bereits in der T_4 -Generation durch die AG D. Salt Homozygotie der T-DNA-Mutante *mtp2-S3* nachgewiesen wurde, wurde dies bei Pflanzen der T_5 -Generation überprüft. Es wurde gDNA isoliert und PCR zum Test auf Homozygotie bezüglich der T-DNA-Insertion in *AtMTP2* durchgeführt. Für erfolgreiche Amplifikation der *Left Border* zwischen T-DNA und *AtMTP2* mit den Primern LBA1 und ZAT2tpX wurde ein Produkt mit einer Größe von 568 bp erwartet und für die Amplifikation des kompletten *AtMTP2*-ORF mit den Primern rtZAT2F und ZAT2tpX ein Produkt von 808 bp Größe. PCR wurde für die zwei Primersätze unabhängig durchgeführt und für die Beladung des Gels zusammengehörige Proben vereint.

nomischen Sequenz entstehen, können mit Schemas wie in **Abbildung 4.18** ausgerechnet werden. Für eine Reihe von möglichen Konfigurationen der T-DNA-Insertion wurde dies in **Tabelle 4.1** getan. Durch *Agrobacterium* vermittelte Transformationen führen häufig zu Mehrfach-Insertionen, wobei neben mehreren unabhängigen Loci mit Einfach-Insertionen durch Rekombinationsprozesse auch komplexe Mehrfach-Insertionen an einem einzelnen Locus entstehen können (De Buck *et al.*, 1999). In letzterem Falle wurde bei Kopf-zu-Kopf Insertionen immer eine präzise RB-zu-RB Verbindung beobachtet, wohingegen es bei Schwanz-zu-Schwanz (LB-zu-LB) bzw. Kopf-zu-Schwanz (RB-zu-LB) Verbindungen zu Insertionen von Vektor-DNA bzw. anderer DNA zwischen den T-DNA-Enden kommen kann. In der Arbeitsgruppe von D. Salt wurde zur Detektion ein ^{32}P -markiertes *AtMTP2*-Fragment eingesetzt, wodurch Dreifach-Insertionen von T-DNA im *MTP2*-Locus sowie unabhängige T-DNA-Insertionen *nicht* nachgewiesen werden können. Daher wurden noch einmal *Southern Blots* mit sieben Pflanzen der T_5 -Generation durchgeführt, bei denen ein ^{32}P -markiertes *NPTII*-Fragment als Sonde zur Detektion der Kanamycin-Kassette in der T-DNA eingesetzt wurde. Bei diesem in **Abbildung 4.17** dargestellten Experiment wurden zwei Banden von ≈ 7700 bp und ≈ 4600 bp Größe beobachtet.

Bei Dreifach-Insertion mit *Left Borders* beidseitig der Insertionsstelle sind mit 6918 bp und 4380 bp Banden zu erwarten, die den beobachteten Größen nahe kommen. In diesem Fall kann lediglich die Diskrepanz zwischen der erwarteten/beobachteten Bande mit einer Größe von 6918 bp/ ≈ 7700 bp nicht durch die Insertion von DNA erklärt werden, da Insertion von DNA zwischen verbundenen *Right Borders* zweier T-DNAs in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde (De Buck *et al.*, 1999). Das Vorhandensein von *AtMTP2*-DNA zwischen den T-DNAs könnte allerdings auf zwei unabhängige Insertionen im *MTP2*-Locus zurückgehen (eine Einfach-Insertion und eine Zweifach-Insertion). Alle in der **Tabelle 4.1** dargestellten Daten deuten daher auf eine Dreifach-Insertion im *AtMTP2*-Locus hin, da sich alle anderen Varianten gegenseitig ausschließen. Mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen ist auch eine zusätzliche T-DNA-Insertion an einer anderen Stelle im Genom. Bei Verwendung des ^{32}P -markierten *NPTII*-Fragmentes als Sonde käme eine der beiden beobachteten Banden in diesem Falle aus dem *MTP2*-Locus und die zweite aus einem zusätzlichen Locus. Nur bei zwei in **Tabel-**

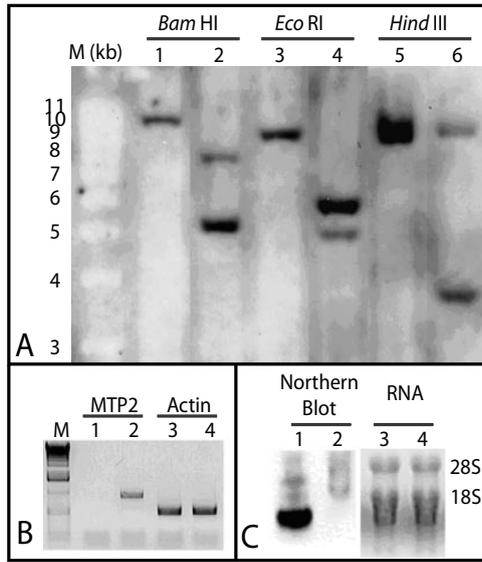


Abb. 4.16: Daten der AG D. Salt: *Southern Blots*, *Northern Blots* und RT-PCR von *mtp2-S3*. *A* *Southern Blot* eines Individuums der T₄-Generation der *mtp2-S3*-Linie. Aus Blattmaterial von Wildtyppflanzen (1, 3, 5) und der *mtp2-S3*-Mutante (2, 4, 6) wurde gDNA isoliert und Restriktionsverdau mit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III durchgeführt. Als Sonde wurde der komplette ³²P-markierte *AtMTP2*-ORF eingesetzt. *B* Bestimmung der Expression der *AtMTP2*-mRNA in der T-DNA-Mutante *mtp2-S3* durch RT-PCR: *mtp2-S3* (1, 3) und Wildtyp (2, 4) von *A. thaliana*. Gesamt-RNA wurde isoliert aus Blättern, cDNA mittels *Reverse Transcriptase* synthetisiert und PCR amplifiziert mit *AtMTP2*-Primern oder *Actin*-Primern. *C* Hybridisierungsanalyse von 10 mg Aliquots der Gesamt-RNA. Die RNA wurde aus dem Wildtyp (2, 4) und der *mtp2-S3*-T-DNA-Mutante (1, 3) isoliert, mittels eines Agarose-Formaldehyd-Gels fraktioniert, auf eine Nylonmembran transferiert und mit ³²P-markierten PCR-Produkten von *AtMTP2* hybridisiert. Als Kontrolle für die Gel-Beladung wurde rRNA zum Vergleich dargestellt (3,4). Der Mutante fehlt die entsprechende Wildtypbande, wodurch *Knockout* der Expression angezeigt wird.

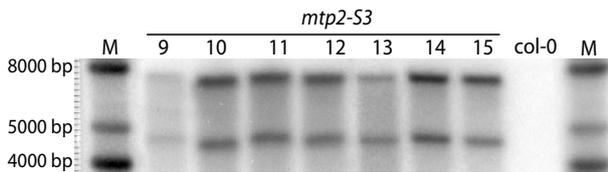


Abb. 4.17: *Southern Blot* von Individuen der T₅-Generation der *mtp2-S3*-Linie. Aus Blattmaterial der Individuen wurde gDNA isoliert und Restriktionsverdau mit *Xba*I durchgeführt. Als Sonde wurde ein ³²P-markiertes *NPTII*-Fragment eingesetzt.

Tab. 4.1: *Southern Blots* von Individuen der *mtp2-S3*-Linie. Alle *Southern Blots* mit der ³²P-*AtMTP2*-Sonde wurden in der Arbeitsgruppe von D. Salt durchgeführt (ABBILDUNG 4.16). Der *Blot*, bei dem eine ³²P-*NPTII*-Sonde verwendet wurde, ist in ABBILDUNG 4.17 dargestellt. Die Position und Orientierung der T-DNA am 3'-Terminus von *AtMTP2* ist bekannt, da die *Knockout*-Mutante durch Sequenzierung mit dem *Left Border*-(LB)-Primer LBa1 identifiziert wurde. Aufgelistet sind die Größen der Banden, die bei zusätzlichen T-DNA-Insertionen zu erwarten wären. Alle Restriktionsenzyme schneiden einmal innerhalb der T-DNA sowie *upstream* und *downstream* von *AtMTP2* (ABBILDUNG 4.18). Orientierung der T-DNA: *Left Border*-*Right Border* entspricht →.

T-DNAs im <i>AtMTP2</i> Locus		³² P- <i>AtMTP2</i> -Sonde				³² P- <i>NPTII</i> -Sonde			
Anzahl	Orientierung (5' <i>MTP2</i> -T-DNAs- <i>MTP2</i> 3')	<i>Eco</i> RI		<i>Hind</i> III		<i>Bam</i> HI		<i>Xba</i> I	
		erw. (bp)	beob. (bp)	erw. (bp)	beob. (bp)	erw. (bp)	beob. (bp)	erw. (bp)	beob. (bp)
0		9477		9344		11076		-	
1	←	8888		9978		8621		5667	
		4969		3748		7720		-	
2	←←	8888		9978		8621		5667	
		4969		3748		7720		4380	
2	→←	5766		9371		8621		6918	
		4969		3748		5170		-	
3	→→← (& →←←)	5766	≈5900	9371	<10000	8621	>8000	6918	≈7700
		4969	≈5000	3748	≈3800	5170	≈5200	4380	≈4600
3	←←←	8888		9978		8621		5667	
		4969		3748		7720		4380	
3	←→←	8888		9978		8621		6918	
		4969		3748		7720		5667	

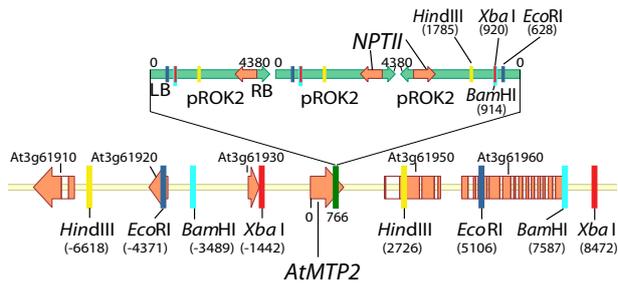


Abb. 4.18: Schematische Darstellung der T-DNA-Insertion in *mtp2-S3*. Die Annahme, dass drei T-DNAs in der dargestellten Konfiguration in *AtMTP2* integriert sind, ergibt sich aus der Analyse aller durchgeführten *Southern Blots* (TABELLE 4.1). Die Positionen innerhalb der genomischen Sequenz wurden relativ zum Start-ATG von *AtMTP2* (=1) angegeben. Die Positionen innerhalb der T-DNA des Vektors pROK2 beziehen sich auf den Start der *Left Border* der T-DNA.

le 4.1 dargestellten Fällen würde die Insertion im *MTP2*-Locus zu einer einzigen detektierbaren Bande führen. Keine der beiden mit dem ^{32}P -markierten *NPTII*-Fragment detektierten Banden (Abbildung 4.17) weist die in diesen zwei Fällen jeweils zu erwartende Größe auf. Eine sichere Aussage in Bezug auf die Anzahl unabhängiger T-DNA-Insertionen kann erst durch die Analyse der F_2 -Generation der Rückkreuzung von *mtp2-S3* mit dem Wildtyp getroffen werden (Abschnitt 4.2.8). Mittel PCR konnte mit den Primern LBA1/ZAT2tpX (Abbildung 4.15) bzw. LBB1/ZAT2tpX (Abbildung 4.26) nur eine Grenze zwischen T-DNA und *AtMTP2* amplifiziert werden. Mit allen anderen getesteten Kombinationen zwischen den T-DNA-Primern RBA1, RBB1, LBA1, LBB1 und den genspezifischen Primern ZAT2tpA, ZAT2tpX (Sequenzen in Anhang A.1.1) konnte kein Produkt amplifiziert werden. Sequenzen zwischen zwei T-DNAs können mit den T-DNA-Primern mittels PCR nicht amplifiziert werden, da die redundanten T-DNA-Sequenzen zur Formation von Haarnadelschleifen führen.

4.2.6 Phänotypisierung der *A. thaliana mtp2-S3*-Mutante

Nachdem bereits in der Arbeitsgruppe von David Salt gezeigt wurde, dass die *mtp2-S3*-Mutante kein *AtMTP2*-Transkript aufwies, sollte die Linie phänotypisiert werden. Hierzu wurden bereits einige Experimente in der AG D. Salt durchgeführt: Für Cd-, Co- und Ni-Stress wurde kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und *mtp2-S3* festgestellt, wenn Pflanzen auf Platten unter diesen Bedingungen angezogen und einen Monat inkubiert wurden. Auch unter oxidativem Stress, der mittels t-Butylhydroxid ausgelöst wurde, konnte kein offensichtlicher Phänotyp für *mtp2-S3* beobachtet werden. Promotor:: *GUS*-Analysen und Affymetrix GeneChip®-Experimente deuteten darauf hin, dass *AtMTP2* unter Zn-Mangelbedingungen exprimiert wird (s. S. 62). Wie in Abschnitt 4.2.2, 4.2.3 und 4.2.4 erläutert, ist *AtMTP2* sehr wahrscheinlich im ER von Epidermiszellen der Wurzelspitze lokalisiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *AtMTP2* unter Zn-Mangelbedingungen Zn ins Lumen des ER transportiert. Dies könnte verschiedene Funktionen haben: Im Falle einer Zn-Mangel induzierten UPR in *Arabidopsis* analog zur Hefe könnte hierdurch die Zn-Zufuhr in das ER erhöht werden. Vorstellbar ist auch, dass unter Zn-Schock-Bedingungen das ins Zytoplasma eindringende Zn möglicherweise durch Transport ins ER detoxifiziert wird. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass unter Zn-Mangel alle Zn-Aufnahmesysteme in der Pflanze hochreguliert werden, um den Mangel zu kompensieren. Erreicht

die Wurzel einen Bereich mit hohen bioverfügbaren Zn-Konzentrationen, könnte dies zur Zn-Überflutung der aufnehmenden epidermalen Zellen führen. Um diese Gefahr zu mindern, wäre es möglich, dass für diese Situation spezielle Mechanismen existieren, um den Schock abzuf puffern. In der Tat wurde ein Mechanismus dieser Art in Hefe beschrieben (MacDiarmid *et al.*, 2003), wobei der vakuoläre Zn-Transporter Zrc1 eine duale Funktion hat: Einerseits spielt Zrc1 eine Rolle bei der Zn-Toleranz, indem ein zytoplasmatischer Zn-Überschuss abgebaut wird durch Zn-Transport in die Vakuole. Andererseits wird auch durch stark Zn-limitierende Bedingungen die Expression von Zrc1 induziert, was die Hefe befähigt, den bei Zn-Zugabe auftretenden Zn-Schock abzuf puffern.

Um der These nachzugehen, dass bei *A. thaliana* MTP2 einen Zn-Schock durch Transport von im Übermaß in die Zelle eintretendem Zn ins ER abpuffert, wurden *mtp2-S3*- und Wildtyppflanzen auf Medium ohne zugegebenes Zn angezogen und nach acht Tagen auf Platten mit verschiedenen Zn-Konzentrationen transferiert. Die Zn-Konzentrationen, auf welche die Pflanzen in einem ersten Experiment transferiert wurden, sind unter normalen Bedingungen für *A. thaliana* nicht- ($1 \mu\text{M}$ Zn), moderat- ($30 \mu\text{M}$) bis hochtoxisch ($100 \mu\text{M}$). Als Maß für die Toleranz der Pflanze wurde das Wurzel-längenwachstum gemessen. Bei diesem Experiment wurde nach Transfer auf über $30 \mu\text{M}$ Zn sowohl für Wildtypkeimlinge, als auch für *mtp2-S3*-Keimlinge kein Wachstum mehr beobachtet (nicht dargestellt). Um den Bereich weiter einzugrenzen, wurden beim nächsten Experiment die Pflanzen auf niedrigere Zn-Konzentrationen überführt. Nach Transfer auf über $10 \mu\text{M}$ Zn stellten sowohl Wildtyp als auch *mtp2-S3* das Wachstum ein (**Abbildung 4.19**). Damit wurde gezeigt, dass Zn-Schock tatsächlich eine Wachstumsbedingung ist, die eine Gefahr für das Überleben von *A. thaliana* darstellen kann. Ohne diese Zn-Schock-Bedingungen, d. h. nach Anzucht auf $1 \mu\text{M}$ Zn, kann *Arabidopsis* nach einem Transfer Zn-Konzentrationen über $100 \mu\text{M}$ tolerieren. Die Interpretation des in **Abbildung 4.19** gezeigten Experiments ist dadurch erschwert, dass sich nach dem Transfer der Zn-defizienten Keimlinge auf Zn-haltige Medien möglicherweise zwei Effekte überlagern: Erstens, die Erholung des Wachstums durch die Versorgung mit Zn. Zweitens, die Inhibition des Wachstums durch Zn-Schock.

Eine unerwartete Beobachtung war, dass Wildtyppflanzen auf Platten ohne zugegebenes Zn deutlich schlechter wuchsen als *mtp2-S3*-Pflanzen, nach dem Transfer auf Platten mit höheren Zn-Konzentrationen diesen Rückstand aber bis zum Tag 16–20 (nach Aussaat) aufholten. Dieses schlechtere Wachstum von Wildtyppflanzen unter Zn-defizienten Bedingungen konnte zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Als Ursache wurde unter anderem unterschiedliche »Fitness« der Samen vermutet. Die Möglichkeit, dass es sich um einen realen Phänotyp handelte, konnte nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass Wildtyppflanzen den Wachstumsrückstand aufholten, geht auf eine höhere *relative* Wurzelverlängerung der Wildtyppflanzen im Vergleich zu *mtp2-S3*-Pflanzen zurück, nachdem sie auf höhere Zn-Konzentrationen transferiert wurden. Für die in **Abbildung 4.20** dargestellte relative Wurzelverlängerung wurde die Verlängerung der Wurzel acht Tage nach dem Transfer (8–16 DAS) bezogen auf die Länge der Wurzel am Tag des Transfers (acht DAS). Wie in Teil *A* der **Abbildung**

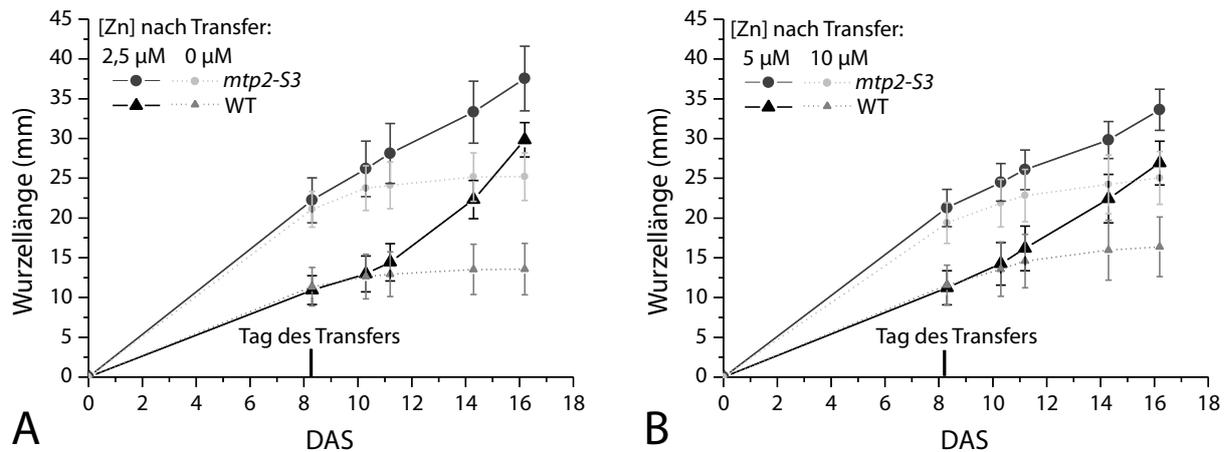


Abb. 4.19: Wurzelwachstum von *mtp2-S3* und Wildtyp unter Zn-Schock-Bedingungen. Sterilisierte Samen der T₅-Generation der T-DNA-Linie *mtp2-S3* und vom Wildtyp wurden auf HOAG-Medium gekeimt, das 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose, 0 µM Zn und 0,5 % (m/V) Saccharose enthielt. Acht Tage nach Aussaat wurden die Pflanzen von diesem Medium, dem kein Zn zugegeben wurde, auf Medien transferiert, die verschiedenen Zn-Konzentrationen (A 0 und 2,5 µM Zn, B 5 und 10 µM Zn) aber keine Saccharose enthielten. Angegeben ist die Standardabweichung, die auf Grundlage von je 15 Individuen auf einer Platte pro Zn-Konzentration berechnet wurde.

zu sehen, ist im Fall des Transfers der Pflanzen auf 1, 2,5 und 5 µM Zn die durchschnittliche relative Wurzelverlängerung für den Wildtyp im Vergleich zur *mtp2-S3*-Mutante jeweils doppelt so groß. Es liegt nahe daraus zu schlussfolgern, dass *mtp2-S3* tatsächlich sensitiver gegenüber Zn-Schock ist als der Wildtyp. Dagegen spricht allerdings Diagramm B in der Abbildung: Es ist vorstellbar, dass die höhere relative Wachstumsrate der Wildtyppflanzen auf die kürzere Wurzellänge am Tag des Transfers zurückgeht und die Pflanzen lediglich einen Wachstumsschub nach Transfer auf Zn-haltige Medien erfahren. Um dieser These nachzugehen, wurde in Diagramm B die Wurzellänge am Tag des Transfers aufgetragen gegen die relative Wurzelverlängerung nach dem Transfer. Tatsächlich scheint eine Abhängigkeit zwischen relativer Wurzelverlängerung (oder -rate) und der Länge der Wurzel am Tag des Transfers – unabhängig vom Genotyp – zu bestehen: Mit zunehmender Wurzellänge am Tag des Transfers sinkt die relative Wurzelverlängerung nach dem Transfer und nähert sich asymptotisch der X-Achse.⁸ Es scheint somit, dass Wildtyppflanzen nur deswegen eine höhere relative Wurzelwachstumsrate haben, weil sie am Tag des Transfers kleiner sind. Sobald das Wachstum nicht mehr durch die Abwesenheit von Zn inhibiert wird, erfahren kleinere Pflanzen einen größeren Wachstumsschub als größere Pflanzen. Nach dem Transfer von Medien ohne zugegebenes Zn auf Medien mit Zn wird somit der Zn-Schock, der mit steigender Zn-Konzentration zu reduziertem Wurzelwachstum führt, überlagert von einem Wachstumsschub, den die Pflanzen aufgrund der Gabe von Zn erfahren. Das Diagramm B deutet darauf hin, dass die Abnahme der Wachstumsrate nach dem Transfer mit steigender Wurzellänge am Tag des Transfers für alle Genotypen gleich ist. Unterschiede zwischen den Genotypen wären

⁸Lineare Abnahme würde bedeuten, dass ab einer gewissen Wurzellänge am Tag des Transfers kein Wachstum nach dem Transfer mehr stattfindet.

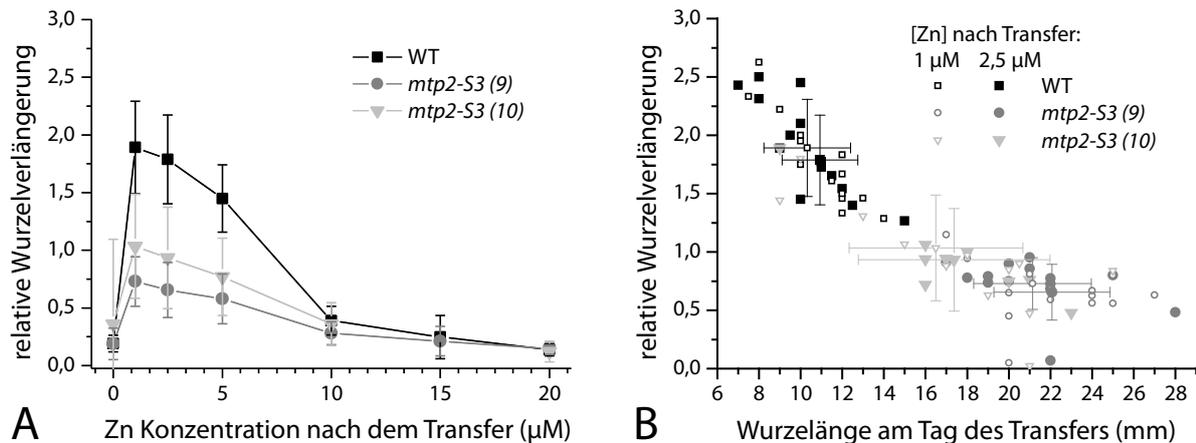


Abb. 4.20: Relative Wurzelverlängerung von *mtp2-S3* und Wildtyp unter Zn-Schock-Bedingungen. Das Experiment wurde durchgeführt wie in ABILDUNG 4.19 beschrieben. Für die relative Wurzelverlängerung wurde die Verlängerung der Wurzel innerhalb von acht Tagen nach dem Transfer geteilt durch die Länge der Wurzel am Tag des Transfers. In Diagramm A ist zu erkennen, dass nach Transfer auf Medien mit 1, 2,5 und 5 µM Zn die relative Wurzelverlängerung des Wildtyps höher ist als die der Mutante. Dies geht jedoch nicht auf eine unterschiedliche Reaktion gegenüber Zn zurück, sondern auf das unterschiedliche Wachstum von Wildtyp- und *mtp2-S3*-Pflanzen vor dem Transfer: Diagramm B zeigt am Beispiel des Transfers auf 1 und 2,5 µM Zn (exemplarisch für alle Konzentrationen), dass die relative Wurzelverlängerung nach dem Transfer mit zunehmender Wurzellänge am Tag des Transfers asymptotisch abnimmt. Unterschiede zwischen dem Wildtyp und *mtp2-S3* wären – nach Anpassung der Daten mit einer asymptotischen Funktion – an versetzt verlaufenden Regressionskurven erkennbar. Aufgrund zu geringer Überlappung der Wurzellängen am Tag des Transfers zwischen den Genotypen können keine Unterscheide zwischen Wildtyp und *mtp2-S3* gezeigt werden.

durch parallel verlaufende Fitkurven⁹ zu erkennen. Ein Vergleich zwischen den Genotypen auf Grundlage eines asymptotischen Fits ist allerdings nicht möglich, da hierfür eine zu geringe Überlappung der Wurzellängen am Tag des Transfers zwischen den Genotypen existiert.

Zusammenfassend wurden drei Beobachtungen gemacht: Zum ersten wurde die Annahme, dass *A. thaliana* sensitiv gegenüber Zn-Schock ist, in zwei Experimenten bestätigt. Pflanzen erleiden Schäden nach Transfer auf Zn-Konzentrationen, die unter Nicht-Zn-Schock-Bedingungen harmlos sind. Zweitens wachsen Wildtyppflanzen auf Medium, dem kein Zn zugegeben wurde, schlechter als *mtp2-S3*-Pflanzen. Die dritte Beobachtung ist, dass Wildtyppflanzen nach Transfer auf Zn-haltige Medien einen höheren Wachstumsschub erfahren als Pflanzen der *mtp2-S3*-Mutante. Dieser Unterschied war bei allen Zn-Konzentrationen gleich und geht wahrscheinlich lediglich auf das schlechtere Wachstum des Wildtyps vor dem Transfer zurück. Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Zn-Schock zwischen *mtp2-S3*- und Wildtyppflanzen scheinen somit nicht zu existieren.

Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurde eine Reihe von Wiederholungen dieses Experiments durchgeführt. Bereits beim folgenden Experiment war die erste Beobachtung, der stark inhibierende Effekt auf das Wachstum bei Transfer auf Zn-Konzentrationen über 10 µM, weniger ausgeprägt als bei

⁹Um Missverständnisse zu vermeiden, wird in dieser Arbeit statt »Anpassung« oder »Ausgleichskurve« das englische Wort *Fit* verwendet.

den zwei Experimenten zuvor (vergl. **Abbildung 4.19** und **4.21**). Bei den bis dahin durchgeführten Ex-

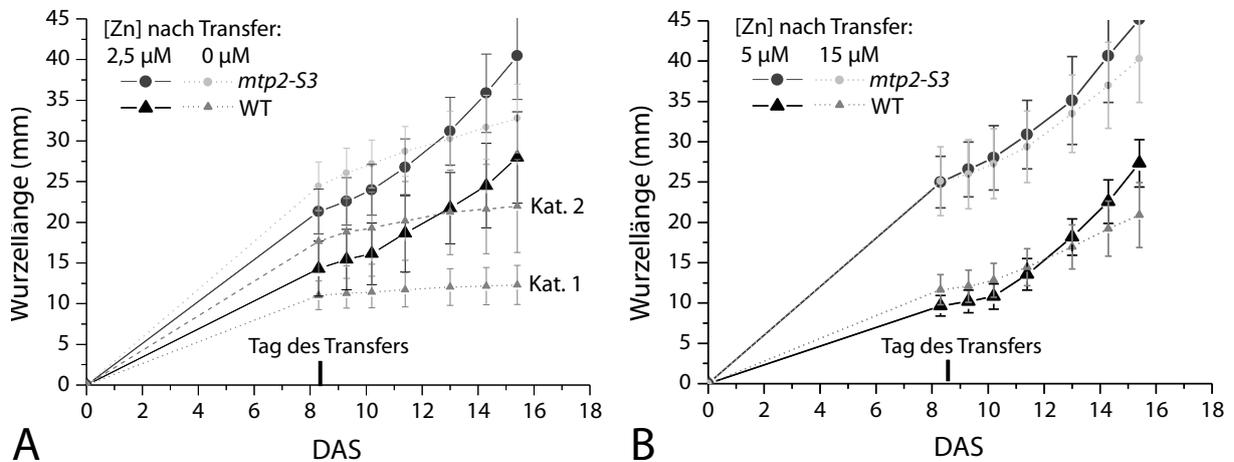


Abb. 4.21: Wiederholung: Wurzelwachstum von *mtp2-S3* und Wildtyp unter Zn-Schock-Bedingungen. Das Experiment wurde durchgeführt wie in **ABILDUNG 4.19** beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Medien nach dem Transfer (A 0 und 2,5 µM Zn, B 5 und 15 µM Zn) ebenfalls Saccharose enthielten. Das bessere Wachstum auf 0 µM Zn im Fall der als »Kategorie 2« bezeichneten Wildtyppflanzen (vergl. **ABILDUNG 4.22**), geht wahrscheinlich auf Zn-Kontamination der Medien durch die verwendeten Polyethylenplatten zurück (siehe Text und **TABELLE 4.2**). Bei allen weiteren Wiederholungen entsprach das Wachstum des Wildtyps auf Medien ohne zugegebenes Zn der Kategorie 2 (vergl. **ABILDUNG 4.24**).

perimenten wurde von Zn-freien Medien *mit* Saccharose auf Medien *ohne* Saccharose transferiert. Es ist bekannt, dass bei einem hohen Stickstoff/Kohlenhydrat-Verhältnis vermehrt Seitenwurzeln gebildet werden. Da die hohe Anzahl der Seitenwurzeln bei der Auswertung störte, wurde bei allen weiteren Wiederholungen 0,5 % Saccharose zu den Medien nach dem Transfer zugegeben, was der Konzentration vor dem Transfer entspricht. Es ist vorstellbar, dass dies auch Einfluss auf die Toxizität von Zn nach dem Transfer hat. Aufgrund der folgenden Beobachtung wurde allerdings vermutet, dass nicht die Gabe von Zucker der Grund für das bessere Wachstum nach dem Transfer ist, sondern Zn-Kontamination der Null-Zn-Platten, die das Ausmaß des Zn-Schocks minimiert: Wie unter Punkt zwei oben erwähnt, wuchsen Wildtyppflanzen auf Medien ohne zugegebenes Zn deutlich schlechter als *mtp2-S3*. Bei dem in **Abbildung 4.21** dargestellten Wiederholungsexperiment wurde das zuvor beobachtete schlechte Wachstum des Wildtyps nur auf einer von drei identischen HOAG-Agarose-Platten deutlich beobachtet (Kategorie 1; *D* in **Abbildung 4.22**). Auf den beiden anderen technischen Replikaten waren die Wurzeln der Wildtyppflanzen acht Tage nach Aussaat rund doppelt so lang (Kategorie 2; *C* in **Abbildung 4.22**) und erreichten fast die Länge der *mtp2-S3*-Pflanzen. Unterschiedliche »Fitness« der Samen kann als Ursache ausgeschlossen werden, da auf diesen drei technischen Replikaten dieselben Samen plattiert wurden. Als wahrscheinlichster Unterschied zwischen den drei Platten kommt der verwendete Platten-Batch in Frage, da alle anderen Variablen – wie zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellte Medien – ausgeschlossen werden konnten. Beim Transfer der Pflanzen wurde der unterschiedlichen Länge der Pflanzen nicht soviel Augenmerk geschenkt, weshalb in der Folge nur auf den

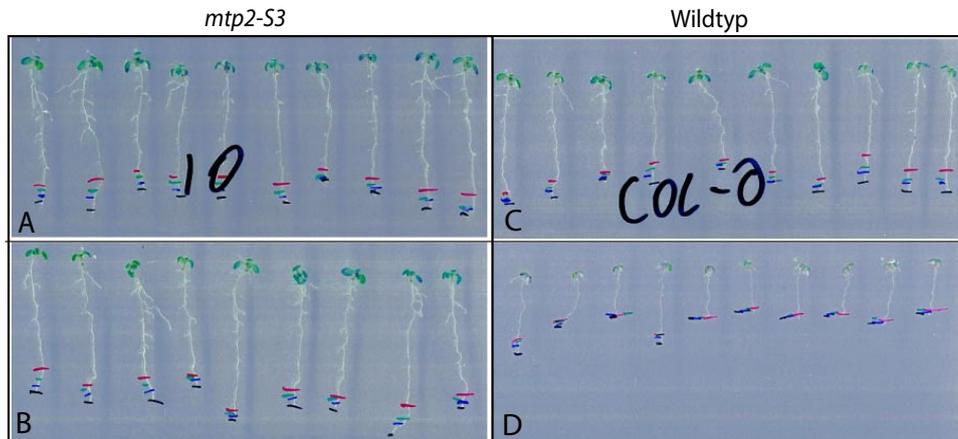


Abb. 4.22: Wurzelwachstum von *mtp2-S3* und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn. Sterilisierte Samen der T₅-Generation der T-DNA-Linie *mtp2-S3* (A, B) und vom Wildtyp (C, D) wurden auf HOAG-Medium gekeimt, das 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose, 0 μ M Zn, 0,5 % (m/V) Saccharose enthielt. Dargestellt wurden jeweils zwei technische Replikate. Bei diesem Experiment wurde bei einem technischen Replikate deutlich besseres Wachstum des Wildtyp beobachtet (C und ABBILDUNG 4.21). Bei allen weiteren Wiederholungen des Experiments entsprach das Wachstum des Wildtyps auf Medien ohne zugegebenes Zn dem Wachstum auf C (vergl. ABBILDUNG 4.24). Wildtyp und *mtp2-S3*-Samen stammen von Pflanzen, die zum gleichen Zeitpunkt im Gewächshaus kultiviert wurden. Ursache ist wahrscheinlich Zn-Kontamination durch die verwendeten Polyethylenplatten (siehe Text und TABELLE 4.2).

Platten ohne zugegebenes Zn deutlich zwischen den beiden Kategorien unterschieden werden konnte. Bei allen folgenden Experimenten wuchsen Wildtyppflanzen auf Platten ohne zugegebenes Zn besser und ohne Zeichen von Zn-Defizienz selbst fünfzehn Tage nach Aussaat kontinuierlich weiter. Das zuvor deutliche unterschiedliche Wachstum von *mtp2-S3*- und Wildtyppflanzen auf Platten ohne zugegebenes Zn war nicht mehr so ausgeprägt. Zudem wuchsen sowohl Wildtyp als auch *mtp2-S3*-Pflanzen nach dem Transfer selbst auf Medien mit Zn-Konzentrationen, wo zuvor (ABBILDUNG 4.20) keinerlei Wachstum mehr beobachtet wurde. Als Ursache hierfür wurde Zn-Kontamination der Platten angenommen, welche zur Anzucht der Keimlinge verwendet wurden, um bei diesen Zn-Defizienz auszulösen. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass bei zur Kontrolle durchgeführten GUS-Färbungen mit Pflanzen der *pMTP2::GUS*-Linie 1-1 (Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3), die auf denselben Wachstumsplatten ohne zugegebenes Zn angezogen wurden, keine oder nur sehr wenige Wurzelspitzen Färbung zeigten. Bei der Herstellung von neuem HOAG-Medium wurden daher alle zur Herstellung benötigten Geräte und Gefäße mit Säure gewaschen. Trotzdem konnte keine Zn-Defizienz der Pflanzen erreicht werden. Im Laufe weiterer Wiederholungen wurde die Zn-Konzentration aller verwendeten Stock-Lösungen sowie der Platten mittels ICP OES bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Wurzelverlängerung nicht linear mit sinkender Zn-Konzentration abnimmt. In ABBILDUNG 4.23 ist die Beobachtung dargestellt, dass vielmehr sowohl Wildtyp- als auch *mtp2-S3*-Pflanzen bei normalen Zn-Konzentrationen zwischen 1 und 5 μ M ein deutlich geringeres Wurzelwachstum aufwiesen als bei Konzentrationen im Bereich von 100 nM. Für alle bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Experimente wurde in ABBILDUNG 4.24 das

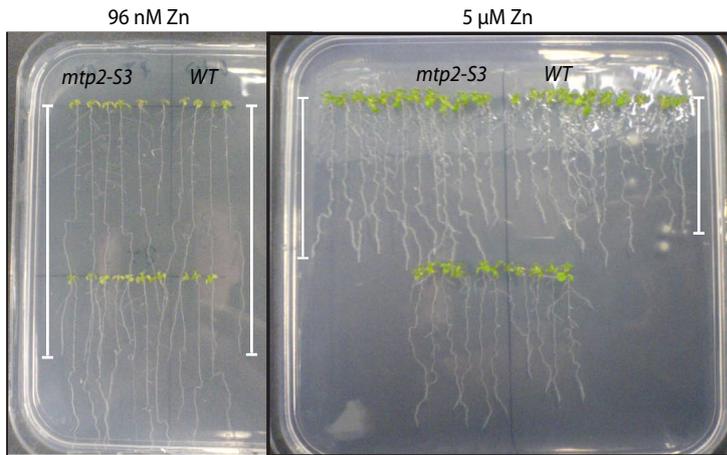


Abb. 4.23: Wiederholung: Wurzelwachstum von *mtp2-S3* und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn. Sterilisierte Samen der T₅-Generation der T-DNA-Linie *mtp2-S3* und vom Wildtyp wurden auf HOAG-Medium gekeimt, das 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose, 0 oder 5 µM zugegebenes Zn und 0,5 % (m/V) Saccharose enthielt. Bei der Herstellung der Medien wurden die im Text erörterten Maßnahmen zur Vermeidung von Zn-Kontamination beachtet. Die Zn-Konzentration auf den Wachstumsplatten wurde mittels ICP OES bestimmt (s. auch TABELLE 4.2).

Wurzelwachstum von *mtp2-S3* und vom Wildtyp auf Medium ohne zugegebenes Zn dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass nur beim ersten Experiment sowohl *mtp2-S3*-Pflanzen als auch Wildtyppflanzen das Wachstum nach einer gewissen Zeit einstellen. Auch Wildtyppflanzen der Kategorie 1 des Folgeexperiments taten dies, obwohl diesen Pflanzen nach dem Transfer weiterhin Saccharose zur Verfügung stand. Wie beim ersten Experiment zeigten diese Pflanzen deutliche Merkmale von Zn-Defizienz. Genaue Betrachtung von **Abbildung 4.24** lässt auf folgendes Szenario schließen: Bei Konzentrationen zwischen 1 und 5 µM Zn wird normales Wurzelwachstum beobachtet. Bei niedrigen Zn-Konzentrationen um 100 nM tritt sehr starkes Wachstum der Primärwurzel auf, wohingegen sehr viel weniger Seitenwurzeln gebildet werden und der oberirdische, grüne Teil der Pflanze deutliche Anzeichen von Zn-Defizienz zeigt (**Abbildung 4.23**). Ab einem gewissen Schwellenwert, der vermutlich bei ca. 10 nM liegt, ist die Pflanze nicht mehr in der Lage, auf die Zn-Defizienz mit verstärktem Wurzelelongationswachstum zu reagieren. Selbst durch Waschen aller Geräte und Gefäße mit Säure sowie der Samen, der Polyethylenplatten und der Seakem-Agarose mit EDTA (**Abschnitt 2.6.3, 2.6.2**) konnte die Zn-Kontamination auf den Wachstumsplatten nicht unter 90 nM gesenkt werden. Anhand der in **Tabelle 4.2** dargestellten ICP OES-Messungen wurde als Hauptursache für die Kontamination Diffusion von Zn aus dem Polyethylen der Wachstumsplatten identifiziert. Die Maßnahmen zur Vermeidung von Zn-Kontamination bei der Herstellung des HOAG-Mediums halfen tatsächlich, die normalerweise eingebrachte Zn-Kontamination im Bereich von 20 bis 100 nM auf nicht detektierbare Werte zu senken. Die in einem Fall beträchtliche Zn-Kontamination einer Wasserprobe ist indikativ für die stete Gefahr einer Zn-Kontamination. In der **Tabelle 4.2** sind Medien aufgelistet, die 15 µM HEDTA enthalten. Diese Medien wurden hergestellt, um zu überprüfen, ob spezifische Komplexbildung von Zn hilft, Zn-Defizienz bei *A. thaliana* zu erreichen. Mit der Software GEOCHEMPC wurde der Einfluss von HEDTA auf die Konzentration von Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ und Zn²⁺ modelliert, um ein Verhältnis zu finden, bei dem die freie Zn-Konzentration von 300 nM auf 0,1 nM gesenkt wird. Wie in der Tabelle zu sehen ist, liegt auch in diesen Medien die Gesamtkonzentration von Zn in den Medien der Platten

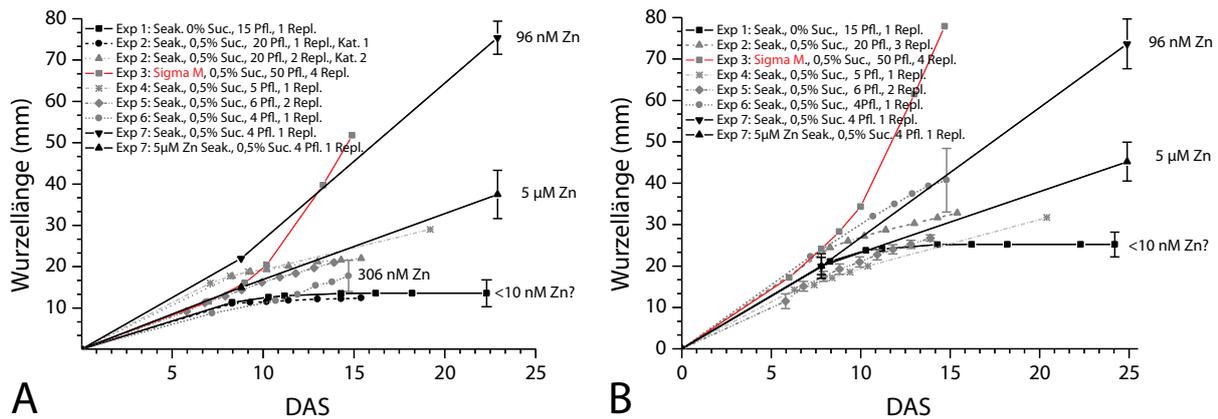


Abb. 4.24: Zusammenfassung aller Experimente: Wurzelwachstum von *mtp2-S3* und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn bis 25 DAS. Sterilisierte Samen der T₅-Generation der T-DNA-Linie *mtp2-S3* und vom Wildtyp wurden auf HOAG-Medium gekeimt, das 0,8 % (m/V) Seakem-Agarose, 0 oder 5 µM zugegebenes Zn und 0,5 % (m/V) Saccharose enthielt. Acht Tage nach Aussaat wurden die Pflanzen von diesem Medium ohne zugegebenes Zn auf Medien mit verschiedenen Zn-Konzentrationen transferiert, die keine (Experiment 1) oder 0,5 % Saccharose enthielten. Dargestellt ist hier nur das Wachstum von *mtp2-S3* und Wildtyp auf Platten ohne zugegebenes Zn. Für jedes Experiment wurde die Gesamtzahl der Pflanzen pro Zn-Konzentration angegeben und die Anzahl der technischen Replikate pro Kondition. Dargestellt sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie einige repräsentative Standardabweichungen. Zu erkennen ist, dass bei allen Experimenten die Wildtyppflanzen (A) schlechter wuchsen, als die *mtp2-S3*-Pflanzen (B).

zwischen 25 und 168 nM. Obwohl auf diesen Platten ein stark beeinträchtigtes Wachstum der Pflanzen beobachtet wurde, konnte kein Unterschied zwischen *mtp2-S3* und dem Wildtyp festgestellt werden. Bei parallel durchgeführten GUS-Assays zur Visualisierung der *pMTP2*-Promotoraktivität der Linie *pMTP2::GUS* 1-1 waren auf diesen Medien zum Teil weniger Wurzelspitzen gefärbt als auf Zn-defizienten HOAG-Agarosemedium ohne HEDTA. Dies deutet darauf hin, dass HEDTA möglicherweise unabhängig von der Zn-Defizienz der Pflanzen das Wachstum schädigt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich Wurzellängenwachstum aus mehreren Gründen als ungeeignet herausgestellt hat, die Hypothese des Zn-Schocks zu überprüfen: Zum ersten konnte bei keiner der neun Wiederholungen dieses Experimentes ein Unterschied im Wurzelwachstum zwischen *mtp2-S3* und Wildtyp festgestellt werden, der deutlich in Abhängigkeit zur Zn-Konzentration stand, auf welche die Pflanzen von Zn-»freien« Medien transferiert wurden. Zweitens ist die Zn-Kontamination der Medien, denen kein Zn-zugegeben wurde, nicht vorhersagbar. Da die Zn-Kontamination großen Einfluss auf das Wachstum der Wurzel hat (**Abbildung 4.23** und **4.24**), ist die Grundlage für einen Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante nicht gegeben. Zudem ist zu vermuten, dass die Adaptation an neue Zn-Konzentrationen sehr rapide innerhalb weniger Stunden erfolgt. Daher wurde für ein zukünftiges Experiment geplant, alternative Marker für den Stress der Zelle zu messen.

Tab. 4.2: Bestimmung der Zn-Kontamination in verschiedenen HOAG-Medien mittels ICP OES. Wo nicht anders angegeben, sollten die Proben Zn-frei sein (0 nM). Da die gemessenen Werte sehr nah am unteren Detektionslimit der ICP OES liegen, wurde eine optimierte Methode erstellt. Es wurden von drei spezifischen Zn-Emissionslinien jeweils die Brechungsordnungen mit der größten Intensität gemessen (zwei Brechungsordnungen von 202,5 nm, je eine von 206,2 nm und 213,8 nm) und das Gerät mit Standardlösungen zwischen 0 und 1,5 μM Zn kalibriert. Messungen müssen aufgrund thermal bedingter Verschiebungen der Optik innerhalb einer halben Stunde nach der Kalibration erfolgen, wobei die Standardabweichung innerhalb dieses Zeitraums bereits von $\approx 1\%$ auf 10% ansteigt. Die angegebene Standardabweichung wurde auf Grundlage des arithmetischen Mittelwertes aller gemessenen Emissionslinien von zwei Messungen berechnet. *PE Platte* Polyethylenplatten, die für vertikale Wachstumsassays im Phytotron benutzt werden (quadratische Platte mit 12 cm Kantenlänge und runde mit 8.5 cm Durchmesser); *Hydroponic* HOAG-Medium von Pflanzen die hydroponisch kultiviert werden; *Standardlsg* Lösungen, die zur Kalibration des Gerätes eingesetzt wurden.

Geräte mit Säure gewaschen, Agar(ose) und PE-Platten mit EDTA gewaschen	Zn (nM)	Keine speziellen Maßnahmen	Zn (nM)
HOAG + Seakem-Agarose in Schott-Flasche	$-6 \pm 7,7$	Wasserprobe 1	$-1 \pm 1,2$
HOAG + Seakem-Agarose auf quad. PE-Platte	$96 \pm 6,2$	Wasserprobe 2	$-14 \pm 4,5$
HOAG + Seakem-Agarose auf runder PE-Platte	$44 \pm 7,4$	Wasserprobe 3	$99 \pm 8,4$
HOAG + Sigma-Typ-A-Agar in Schott-Flasche	$0 \pm 8,8$	Wasserprobe 4	$13 \pm 5,6$
HOAG + Sigma-Typ-A-Agar auf quad. PE-Platte	$220 \pm 9,3$	Wasserprobe 5	$-2 \pm 3,5$
HOAG + Sigma-Typ-A-Agar auf runder PE-Platte	$158 \pm 6,2$	0 nM Standardlsg.	$-6 \pm 4,1$
HOAG + 15 μM HEDTA + Seakem-Agarose in Schott-Flasche	$0 \pm 8,6$	50 nM Standardlsg.	$46 \pm 6,2$
HOAG + 15 μM HEDTA + Seakem-Agarose auf quad. PE-Platte	$22 \pm 5,0$	100 nM Standardlsg.	$93 \pm 7,8$
HOAG + 15 μM HEDTA + Seakem-Agarose auf runder PE-Platte	$117 \pm 4,5$	HOAG-Probe 1	$20 \pm 11,2$
HOAG + 15 μM HEDTA + Sigma-Typ-A-Agar in Schott-Flasche	$36 \pm 7,5$	HOAG-Probe 2	$20 \pm 11,9$
HOAG + 15 μM HEDTA + Sigma-Typ-A-Agar auf quad. PE-Platte	$168 \pm 6,1$	<i>Hydroponic</i> -Probe 1	$32 \pm 11,0$
HOAG + 15 μM HEDTA + Sigma-Typ-A-Agar auf runder PE-Platte	$25 \pm 4,0$	<i>Hydroponic</i> -Probe 2	$34 \pm 11,1$

4.2.7 Elementgehalt der *mtp2-S3*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp

Um zu überprüfen, ob *AtMTP2* unter normalen Bedingungen auf Erde einen Einfluss auf die Metallhomöostase der Pflanze hat, wurden mittels ICP OES die Elementgehalte in Knospen, Blüten, Schoten, Spross, Stengelblättern und Rosettenblättern bestimmt (**Abbildung 4.25**). Mit der Ausnahme des Fe-Gehalts in Rosettenblättern wurde kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt. Für Rosettenblätter wurde diese Messung mit neuem Material wiederholt, um die doppelte Fe-Konzentration in Blättern des Wildtyps im Vergleich zur *mtp2-S3*-Mutante zu bestätigen. Der zuvor beobachtete Unterschied trat hier nicht auf und ging wahrscheinlich auf das unterschiedliche Alter der gemessenen Rosettenblätter des Wildtyps und der *mtp2-S3*-Linie zurück. In einem vorläufigen Experiment wurde in voll entwickelten Rosettenblättern rund doppelt soviel Fe wie in jungen oder seneszenten Blättern gemessen. Obwohl kein Unterschied im Elementgehalt zwischen Mutante und Wildtyp gefunden wurde, ist die Verteilung der Elemente über die Pflanze interessant: Die Konzentration von Ca, Cu und Mo, weniger ausgeprägt auch Co, Cd und Mg, ist am höchsten in Stengel- und Rosettenblättern und geringer in Knospen, Blüten, Schoten und Spross. P und Zn-Gehalte steigen in der Reihe Spross, Stengel- und Rosettenblätter, Schoten, Blüten, Knospen kontinuierlich an. Für die meisten Elemente bis auf K, ist die Konzentration im Spross am geringsten. Die Bestimmung des Elementgehalts in Samen wurde

nicht repliziert und sollte mit Vorsicht interpretiert werden.

4.2.8 Komplementation und Bestätigung eines Phänotyps der *mtp2-S3*-Mutante

Um mit Sicherheit einen Phänotyp der *Knockout*-Mutante der *AtMTP2*-Funktion zuzuordnen, sollte der Phänotyp – insofern er identifiziert wurde – mit unabhängigen Ansätzen bestätigt werden. Eine zweite *Knockout*-Mutante wurde in der Gabi-Kat-Kollektion¹⁰ von T-DNA-Mutanten identifiziert. Zunächst muss die Insertion der T-DNA 154 bp *upstream* des Start-ATG im Bereich des *pMTP2*-Promotors bestätigt werden. Weiterhin muss verifiziert werden, dass die Transkription von *AtMTP2* durch diese Insertion tatsächlich verhindert wird. Aufgrund von Problemen in der T₂-Generation wurden von Gabi-Kat bereits Pflanzen in die T₃-Generation propagiert. Von 14 dieser Pflanzen wurden Samen erhalten, wobei bisher nicht getestet wurde, ob hierunter bereits homozygote Insertionslinien sind. Als Alternative zu T-DNA-*Knockout*-Linien wurde erwogen, *RNA interference* (RNAi)-Linien herzustellen. Da Zweifel bestanden, dass dieser Ansatz bei den sehr niedrigen Transkriptmengen von *AtMTP2* erfolgversprechend ist, wurde dies bisher nicht durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob ein Phänotyp rezessiv und reversibel ist und um eventuelle weitere Mutationen im Genom der *mtp2-S3*-Linie zu beseitigen, wurde die Rückkreuzung der *mtp2-S3*-Mutante mit Col-0 durchgeführt. Hierfür wurde die Mutante mit Pollen von Col-0 bestäubt (Col-0 × *mtp2-S3*) und umgekehrt (*mtp2-S3* × Col-0). Es wurden für beide Richtungen einige Schoten erhalten. Samen der F₁-Generation wurden auf Erde ausgesät und aus Blättern gDNA isoliert, um mittels PCR die Heterozygotie der Pflanzen zu überprüfen. Mit Ausnahme zweier F₁-Individuen der Richtung *mtp2-S3* × Col-0 wurde in allen Pflanzen sowohl die T-DNA-Insertion von *mtp2-S3* identifiziert, als auch der komplette ORF des *AtMTP2*-Wildtypgens von Col-0 (Abbildung 4.26). Für eine Komplementation von *mtp2-S3* wurde die Mutante mit verschiedenen *AtMTP2*-Konstrukten transformiert: *35S::AtMTP2*, *pMTP2::AtMTP2-EGFP*, *pMTP2::EGFP-AtMTP2*. Es liegen jeweils Samen der T₁-Generation vor.

4.2.9 Charakterisierung von *p35S::AtMTP2* Pflanzen

Es liegen Samen der T₃-Generation von acht homozygoten Linien vor. Homozygotie wurde durch Segregationsanalysen bestimmt: Es wurden Linien ausgewählt, für die die Resistenz des Markers in der T₂-Generation als einziger Locus segregierte (3:1). Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde überprüft, ob in den transgenen Linien mehr *AtMTP2*-Transkript vorliegt als im Wildtyp. In Abbildung 4.27 ist zu sehen, dass alle getesteten Linien stark erhöhte MTP2-Transkriptmengen aufweisen. Bei Kultivierung im Gewächshaus konnte bisher kein Phänotyp identifiziert werden. Wie in Abschnitt 4.2.4

¹⁰<http://www.gabi-kat.de/>

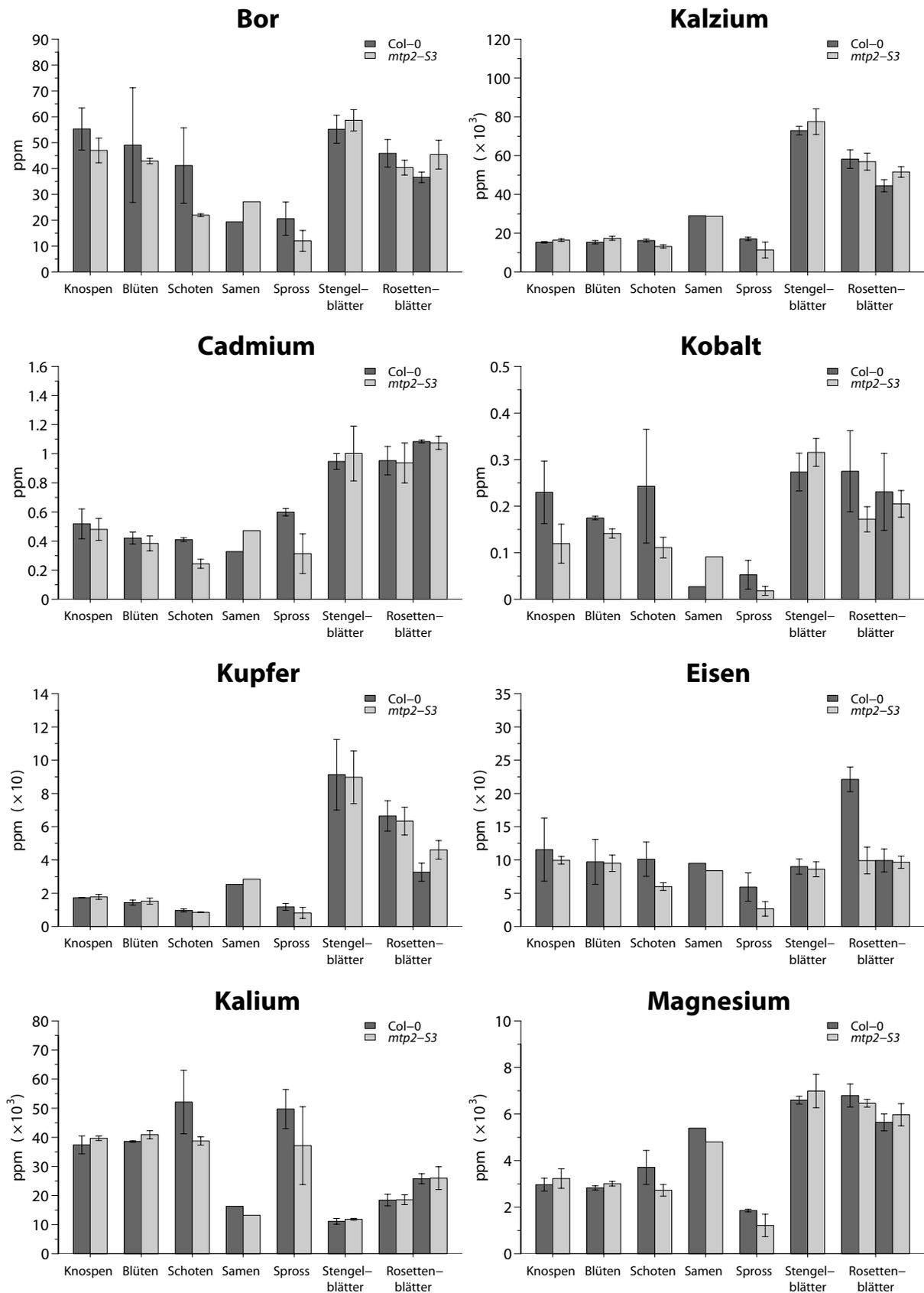


Abb. 4.25: Bestimmung der Elementgehalte in *mtp2-53* und Col-0 mittels ICP OES Fortsetzung auf nächster Seite...

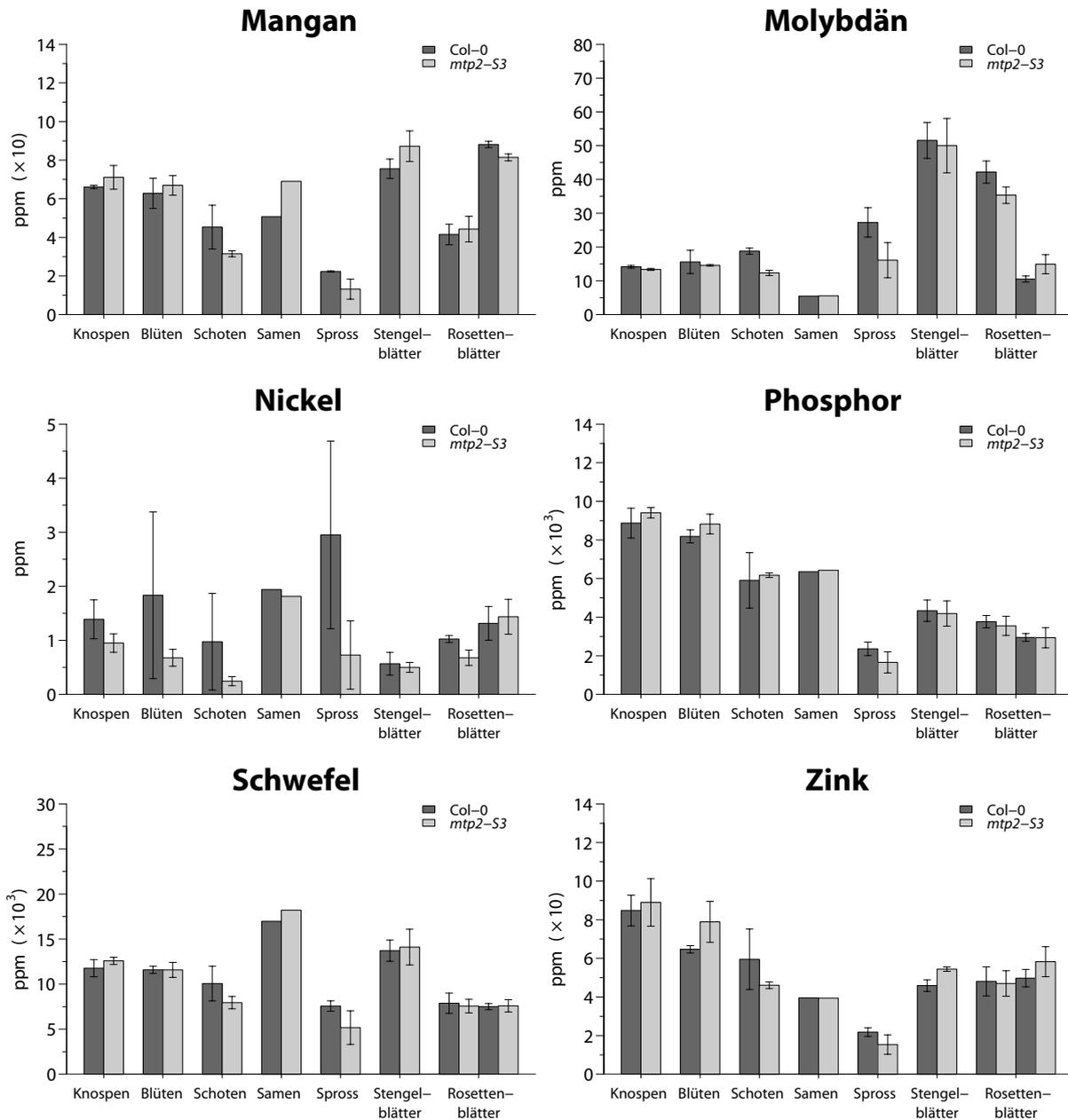


Abb. 4.25: Bestimmung der Elementgehalte in *mtp2-53* und Col-0 mittels ICP OES – Fortsetzung. Pflanzen wurden im Gewächshaus auf Erde kultiviert, wobei die Anordnung der Pflanzen alle sieben Tage zufällig verändert wurde. Es wurden 55 Tage nach Aussaat pro Gewebe fünf Pools geerntet, die jeweils Material von vier Pflanzen enthielten. Zwischen 15 und 200 mg homogenisiertes Material wurden mit 65%iger Salpetersäure in einem mikrowellenbasierten Reaktionsbeschleuniger (MARS 5) aufgeschlossen und die Elementgehalte mittels ICP OES bestimmt.

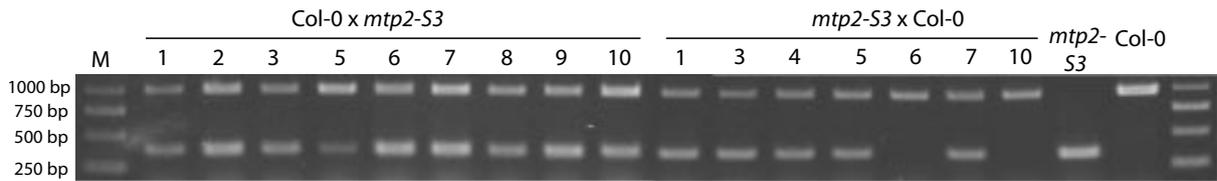


Abb. 4.26: Rückkreuzung von *mtp2-53* mit dem Wildtyp. Die Mutante wurde mit Pollen von Col-0 bestäubt (Col-0 × *mtp2-53*) und umgekehrt (*mtp2-53* × Col-0). Aus Pflanzen der F₁-Generation wurde gDNA isoliert und PCR zum Test auf Heterozygotie bezüglich *AtMTP2* und *mtp2-53* durchgeführt. Für erfolgreiche Amplifikation der *Left Border* zwischen T-DNA und *AtMTP2* mit den Primern LBB1 und ZAT2tpX wurde ein Produkt mit einer Größe von 369 bp erwartet und für die Amplifikation des kompletten *AtMTP2*-ORF mit den Primern ZAT2tpA und ZAT2tpX ein Produkt von 1002 bp Größe. PCR jeder Probe wurde für die zwei Primersätze unabhängig durchgeführt. Für die Beladung des Gels wurden zusammengehörige Proben vereint.

gezeigt, ist *AtMTP2* sehr wahrscheinlich im ER lokalisiert. Der in **Abschnitt 4.2.6** aufgestellten Hypothese folgend, dass *AtMTP2* Zn in das ER transportiert, wurde vermutet, dass bei Wachstum auf moderat toxischen Zn-Konzentrationen *p35S::MTP2*-Linien ein anderes Wachstum aufweisen als der Wildtyp. Dies konnte nicht bestätigt werden. Zn-Akkumulation in diesen Linien wurde bisher nicht analysiert.

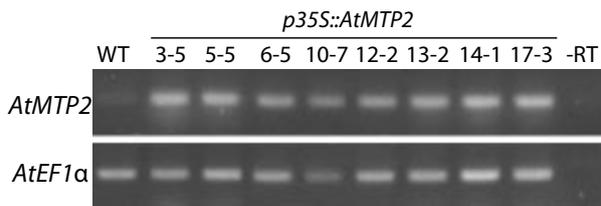


Abb. 4.27: Relative *AtMTP2*-Transkriptmengen in *A. thaliana-p35S::MTP2*-Linien. Aus Blättern je eines Individuums von acht homozygoten Linien der T₃-Generation wurde

RNA isoliert und mittels reverser Transkriptase cDNA synthetisiert. Jeweils 80 ng cDNA wurden als Template in den PCRs eingesetzt, wobei für beide PCR-Varianten 28 Amplifikationszyklen erfolgten. Für das EF1α Primerpaar EF1af und EF1ar wurde mit 475 bp die für cDNA erwartete Produktgröße erhalten (gDNA mit Intron: 575 bp). Mit dem Primerpaar AtCDF2sfa und ZAT2tpX zur Detektion von *AtMTP2* wurde ein Produkt mit der erwarteten Größe von 280 bp amplifiziert.

5 Resultate Teil C: ETV ICP-OES basierte Screeningmethode

5.1 Kopplung eines Geräts für die elektrothermale Verdampfung mit der ICP-OES

In den folgenden Abschnitten wird im Speziellen die Kopplung der ETV-4000 von SPECTRAL SYSTEMS an die IRIS INTREPID HR DUO von THERMO ELEMENTAL beschrieben. Die hierbei erörterte Problematik betrifft nichtsdestotrotz die ETV-ICP OES Kopplung im Allgemeinen. Die vorgestellte Softwareerweiterung für Origin® kann mit geringen Anpassungen auch für die Auswertung von Daten verwendet werden, die mit anderen Gerätekombinationen erhoben wurden.

5.1.1 Problemstellung

Um Proben durch elektrothermale Verdampfung in das Plasma einzubringen, müssen eine Reihe von Geräten synchronisiert zusammenarbeiten. Die Funktion dieser in **Abbildung 5.1** dargestellten Geräte wird im Folgenden kurz umrissen. Im Vergleich zur Messung von flüssigen Proben ergeben sich für die

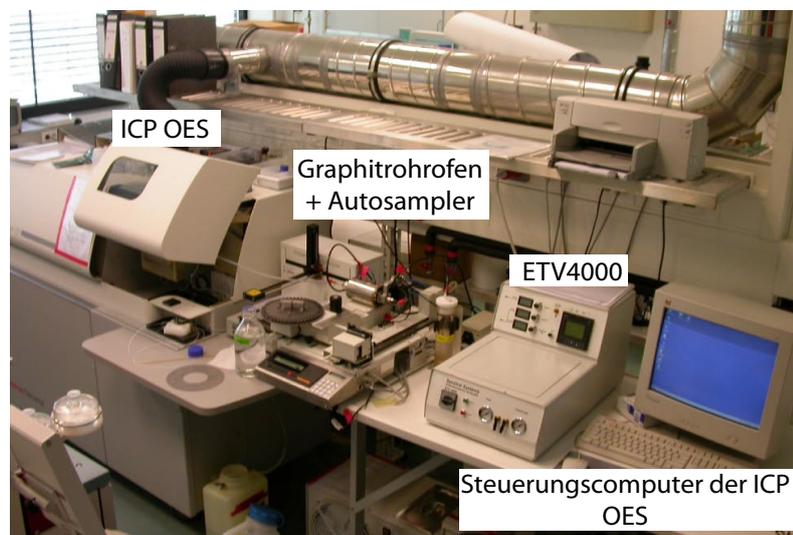


Abb. 5.1: Gerätetechnik der ETV-ICP OES. Der *Autosampler* bestückt den Graphitrohr-Ofen mit Proben, die zuvor an der integrierten Feinwaage in Graphittiegel eingewogen wurden. Im automatischen Modus löst das Schließen der Ofentür ein Signal an das Steuerungsgerät der ETV (ETV4000) aus, welches daraufhin ein Programm zur Verdampfung der Probe abarbeitet. Gleichzeitig gibt dieses Steuerungsgerät ein Signal an den wartenden Steuerungscomputer der ICP OES, der daraufhin mit der Messung beginnt.

ETV-Kopplung einige Veränderungen in der Analytik, da ein grundsätzlich anderes Signal gemessen wird. Der an die ICP OES angeschlossene Computer hat die Funktion der Kontrolle der ICP OES und der Verarbeitung der Messdaten. Bei der üblichen ICP OES-Analytik wird hierbei manuell oder automatisch durch einen *Autosampler* eine Lösung aufgesogen, zerstäubt, in das Plasma überführt und nach Ablauf einer gewissen Vorspülzeit ein konstantes Signal gemessen. Da dieses Signal konstant bleibt, bis die Probe aufgebraucht ist, kann die Software durch einen *Preexposure* für jede Emissionslinie die Intensität bestimmen und die Auslesefrequenz dieser Linien optimieren. Dies ist aufgrund der kumulativen Arbeitsweise des *Charge Injection Device* (CID) Detektors notwendig: Durch den photoelektrischen Effekt führen auf den Chip auftreffende Photonen zu elektrischen Ladungen, die für jeden Pixel bis zum Zeitpunkt des Auslesens gespeichert werden. Daher kann es bei zu niedriger Auslesefrequenz zur Sättigung dieser Speicherpuffer kommen, wodurch kein korrektes Signal mehr gemessen wird. Durch die Optimierung der Auslesefrequenz können gleichzeitig sehr intensive und sehr schwache Emissionslinien gemessen werden. Dieser dynamische Umfang ist bei Kopplung mit der ETV nicht gegeben, da aufgrund des transienten Signals keine Optimierung der Auslesefrequenz für jede Emissionslinie durch einen *Preexposure* erfolgen kann. Vielmehr wird für jedes Element ein Zeitfenster gesetzt, in dem die Integration des Signals erfolgt. Die Auslesefrequenz in diesen Zeitfenstern ist für jede Emissionslinie gleich. Das Integral über die Intensität gibt die vom Detektor in diesem Zeitfenster gemessenen *Counts* (CTS) an, wobei acht Photonen geräteintern einen *Count* auslösen. Angegeben werden die gemittelten *Counts* pro Sekunde ($\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$).

Die TEVA-Software kann in einen Modus für die Detektion transienter Signale geschaltet werden, kann aber nicht alle Geräte steuern, die im Fall der Kopplung der ICP OES mit der ETV synchronisiert zusammenarbeiten müssen. Im Modus zur Messung von transienten Signalen löst der Start einer Messung in der TEVA-Software nicht die Messung an sich aus. Vielmehr wird auf ein Signal von einem externen Gerät – hier das Steuerungsgerät der ETV – zum Start der Messung gewartet. Das Steuerungsgerät der ETV wiederum wartet auf das Signal des *Autosamplers*, mit dem automatisch oder manuell Proben in den Graphitrohr-Ofen eingebracht werden. Der manuelle Aufwand zum Start einer Messung ist groß: Zunächst muss der Kontrollcomputer der ICP OES in den Bereitschaftsmodus für eine Messung geschaltet werden. Dann wird vom Anwender eine Probe am *Autosampler* eingewogen und in den Graphitrohr-Ofen gebracht. Sobald dies geschehen ist, startet der Anwender das Steuerungsgerät der ETV, welches ein Programm zur Verdampfung der Probe abarbeitet und gleichzeitig das Signal an den Steuerungscomputer der ICP OES zum Start der Messung gibt. Diese Vorgänge können teilweise automatisiert werden, indem der Computer der ICP OES nach jeder Messung in den Bereitschaftsmodus für die nächste Messung zurückkehrt (*»Continuous Run«*), der *Autosampler* die zuvor eingewogenen Proben automatisch sequenziell in den Graphitrohr-Ofen schiebt und das Steuerungsgerät der ETV automatisch die Messung auslöst sowie die Probenverdampfung einleitet. Die Messung der ICP OES *muss* beendet sein, bevor die nächste Probe verdampft wird, da die Sequenz des als *Master* fungie-

renden *Autosamplers* nicht von den anderen Geräten unterbrochen werden kann. Dies ist ein großer Nachteil, weil hierdurch bei Gerätefehlern wie einem erloschenen Plasma oder einem durchgebrannten Graphitrohr meist alle folgenden Proben vernichtet werden. Die eingewogenen Mengen der gemessenen Proben können zwar an den Steuerungscomputer der ICP OES übergeben werden, aber die TEVA-Software kann diese – auch in der aktuellen Version 1.6 – nicht auslesen. Soll eine Kalibration für die Messung von Pflanzenmaterial innerhalb der TEVA-Software erfolgen, müsste der Anwender extrem genau vorgegebene Mengen Referenzmaterial (*Certified Reference Material* (CRM)) im Bereich von ≈ 100 ng bis 2 mg einwiegen. Dies gelingt nur mit vielen Korrekturen und ist daher ein sehr zeitaufwendiger Vorgang. Zudem ist es für die Berechnung der Elementkonzentrationen erforderlich, für jede gemessene Probe das Gewicht manuell einzugeben.

Ziel ist es, eine verbesserte Kopplung der ETV mit der ICP OES zu etablieren, mit der eine automatisierte Messung vieler Proben und die Berechnung der Elementkonzentrationen ähnlich einfach und komfortabel gestaltet ist, wie bei der konventionellen ICP OES-Analytik von flüssigen Proben. Wünschenswert wäre zudem eine verbesserte Datenauswertung und -aufbereitung. Nur dadurch kann der erwünschte hohe Durchsatz für einen Screen mit minimalem Arbeitsaufwand erreicht werden. Als Voraussetzung musste zunächst eine Methode zur Verdampfung und Analyse von Pflanzenmaterial etabliert werden. Hierfür wurden zunächst geeignete Emissionslinien zur Bestimmung der Elemente identifiziert (**Abschnitt 5.2.1**). Gleichzeitig wurde ein Temperaturprogramm zur Verdampfung des Pflanzenmaterials entwickelt (**Abschnitt 5.2.2**). Für die automatisierte Analyse der Proben mittels eines 50-fach *Autosampler* wurde der in **Abschnitt 5.2.3** beschriebene Arbeitsablauf etabliert. In **Abschnitt 5.3** wird eine Erweiterung für ORIGIN[®] beschrieben. Diese Erweiterung übernimmt die bei der ETV-ICP OES-Analytik fehlende Funktionalität der TEVA-Software zur Kalibration der Methode und der Analyse von Proben. Auch wenn nur relative Elementgehalte verschiedener Proben verglichen werden sollen, ist eine Kalibration der Methode immer notwendig: Das Sättigungsverhalten ist für alle Emissionslinien unterschiedlich und würde zu falschen Ergebnissen führen, wenn es nicht durch eine Kalibration korrekt beschrieben wird. Über die Berechnung der Elementkonzentrationen hinaus können mit der vorgestellten Erweiterung Experimente mit einer großen Anzahl von Proben ausgewertet werden – inkl. der graphischen Darstellung aller Analysen.

5.2 Entwicklung einer Analysemethode für Pflanzenmaterial

5.2.1 Wahl geeigneter Emissionslinien zur Elementbestimmung

Für die Quantifizierung eines Elements müssen geeignete Emissionslinien gewählt werden, die eine Reihe von Kriterien erfüllen: Zum ersten darf es bei dieser Linie nicht zur Interferenz mit anderen Matrix- oder Analytlinien kommen, d. h. die Linie muss spezifisch für dieses Element sein. In der Ein-

leitung wurde erörtert, dass die Unterschiede in der atomaren Konfiguration für alle Elemente eigentlich spezifische Emissionslinien bedingen. Allerdings liegen diese vielfach so dicht beieinander, dass sie von der Optik nicht spektral getrennt werden können. Bei der Auswahl der Analytlinien sind daher einige Kriterien zu beachten: Erstens sollte für eine Analytlinie bei der IRIS INTREPID HR DUO im Bereich von $\pm 0,025$ nm keine messbare Emission einer zweiter Linie vorliegen. Man konzentriert sich daher auf solche Analytlinien, in deren Nähe entweder nur extrem schwache Emissionslinien von häufigen Elementen oder nur Emissionslinien von sehr seltenen Elementen¹ liegen. Gute Anhaltspunkte liefert hierbei die mit der TEVA-Software mitgelieferte Wellenlängenbibliothek. Zweitens muss die Intensität dieser Analytlinie bei den erwarteten Elementkonzentrationen im gut detektierbaren Bereich sein. Sie sollte nicht unter $\approx 2 \text{ CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ und möglichst nicht über $6000 \text{ CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ liegen. Drittens sollte die Linie gut kalibrierbar sein (**Abschnitt 5.3.1**). Für Punkt zwei und drei muss sichergestellt werden, dass die Elementkonzentrationen im Kalibrationsmaterial und in den Proben ähnlich sind. In einem großen spektralen Bereich bedingt die Eigenemission des Argonplasmas einen intensiven Hintergrund (siehe Abbildung in **Tabelle 5.1**). Schwache Emissionslinien in diesem Bereich sind prinzipiell messbar, da für die Quantifizierung jeder Emissionslinie eine Hintergrundkorrektur angewendet wird: Die hierfür notwendigen Hintergrundintensitäten werden aus Pixeln auf dem CID-Chip ausgelesen, die der Anwender in einem Bereich von $\pm 0,1$ nm neben der Analytlinie definiert. Die dort detektierten Intensitäten werden von der eigentlichen Analytlinie subtrahiert. Eine starke Hintergrundemission verschlechtert aber für schwache Emissionslinien das Signal/Rausch-Verhältnis und führt bei starken Emissionslinien viel schneller zur Sättigung. Unter Berücksichtigung all dieser Kriterien wurden aus ≈ 40 überprüften Emissionslinien die in **Tabelle 5.1** aufgelisteten ausgewählt. Die in dieser Tabelle aufgeführte Na-Emissionslinie bei 268,034 nm ist ein Beispiel für die zuletzt erwähnte Problematik der starken Hintergrundemission: Obwohl hier bei maximaler Einwaage nur $118 \text{ CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ auf die Emission von Natrium zurückgehen, wird bereits die Sättigung des CID-Chips erreicht (**Abbildung 5.5** und **5.7**). Dies liegt an der starken Hintergrundemission durch das Argonplasma in diesem spektralen Bereich. Im Gegensatz dazu wird im vergleichsweise ungestörten Bereich der Zn-Emissionslinie bei 213,856 nm selbst bei $2200 \text{ CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ keine Sättigung erreicht. Für eine Reihe von Elementen konnten keine Emissionslinien gefunden werden, die den oben aufgeführten Kriterien gehorchen. So wurde keine der für As, Co, Cr, K, Ni und Mo getesteten Linien in die Methode aufgenommen.² Mit Ausnahme von K konnte für diese Elemente keine ausreichend intensive Emissionslinie bei der Verdampfung der verwendeten Pflanzenmaterialien identifiziert werden. Bei allen intensiven Ni-Emissionslinien kommt es zur Interferenz mit Si. Dagegen ist K sehr häufig in der Pflanze, weshalb nur relativ

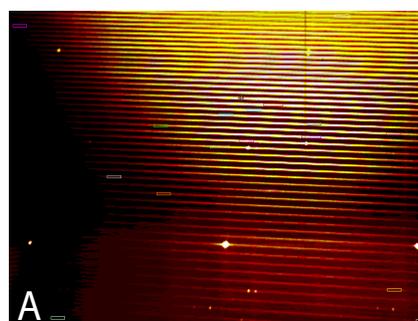
¹Kosmische Häufigkeit der Elemente in Abbildung 344 in Holleman *et al.* (1995)

²Getestete Linien (Brechungsordnung): As 189,042 nm (177), 193,759 nm (173), 197,261 nm (170), Co 228,616 nm (147), 230,786 nm (146), Cr 267,716 nm (125), 283,563 nm (118), K 321,809 nm (81), 344,736 nm (76), Mo 202,030 nm (166), 203,844 nm (165), Ni 216,556 nm (155), 221,647 nm (152), 231,604 nm (145). Die unterstrichenen Linien sind kalibrierbar, erreichen aber bei max. CRM-Einwaage $< 4 \text{ CTS} \cdot \text{s}^{-1}$.

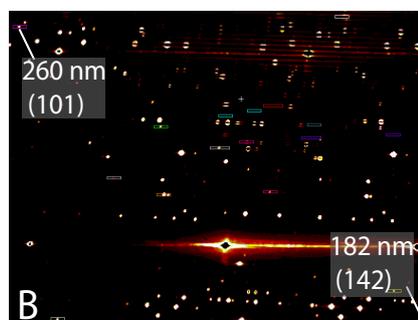
Tab. 5.1: Emissionslinien für die Quantifizierung von Elementen in Pflanzenmaterial. In *A* und *B* ist der für die Detektion relevante Bereich des CID-Chips dargestellt. *A* Intensitätsverteilung nach 50 s Exposition bei der Erhitzung eines leeren Probengefäßes. Im oberen Bereich des Chips bis ≈ 210 nm/125. Brechungsordnung ist sehr deutlich die Eigenemission des Argonplasmas zu erkennen. *B* Intensitätsverteilung nach 50 s bei der Verdampfung von CRM-VTL2 (CRM aus Tabak) abzüglich der Intensität eines leeren Probengefäßes. Temperaturprogramm siehe ABBILDUNG 5.5.

Element	Wellenlänge (nm)	Brechungs- ordnung	Kalibrationsbereich ^a			
			von		bis	
			ng	CTS · s ⁻¹	ng	CTS · s ⁻¹
Al	186,231	139	6,6 · 10 ⁻¹	1,6	8,6 · 10 ²	62,2
Ca	219,779	119	35,0	5,9	46,0 · 10 ³	726,1
Cd	226,502	115	2,7 · 10 ⁻⁴	0,6	3,6 · 10 ⁻¹	14,0
Cu	223,008	117	2,3 · 10 ⁻²	3,1	27,8	71,5
Cu	224,700	116	"	5,7	"	115,5
Fe	216,677	120	3,7 · 10 ⁻¹	5,5	4,9 · 10 ²	887,9
Fe	217,805	119	"	1,3	"	244,6
Mg	202,582	129	7,0	15,5	9,3 · 10 ³	1567,0
Mn	260,569	101	6,8 · 10 ⁻²	0,3	90,0	349,6
Na	268,034	97	9,5 · 10 ⁻¹	9,4	1,2 · 10 ³	118,7
P	203,349	128	6,1	5,4	8,0 · 10 ³	693,3
P	215,408	121	"	6,6	"	1133,0
Pb	220,353	118	3,7 · 10 ⁻³	1,0	4,8	30,9
S	182,034	142	6,9	9,7	9,0 · 10 ³	409,7
S	182,034	144	"	0,8	"	30,7
Zn	206,200	127	6,6 · 10 ⁻²	2,7	87,3	404,5
Zn	213,856	122	"	24,0	"	2213,0

^aBei Einwaage von 2 µg bis 2,5 mg P-ALFALFA (CRM aus Lucerne).



A Leeres Probengefäß



B Tabak minus leeres Probengefäß

schwache Emissionslinien zur Quantifizierung in Frage kommen. Diese liegen jedoch wie bei Na alle in einem spektralen Bereich, der sehr stark von der Emission des Argonplasmas überstrahlt wird.

5.2.2 ETV-Programm zur Verdampfung und Analyse von getrocknetem Pflanzenmaterial

Die Verdampfung der zu analysierenden Probe geschieht in einem Graphitrohr, das durch Strom auf bis zu 2800 °C erhitzt werden kann. In dieses Graphitrohr wird die Probe in einem Graphittiegel eingebracht, dessen Temperatur beim ETV4000-System durch einen Infrarotsensor gemessen wird. Alle erhitzten Komponenten werden mit Argon umspült, um Oxidation zu verhindern, wobei über die Probe ein Argon/Freon³-Gemisch geleitet wird. Durch das Reaktionsgas Freon wird die Probe halogeniert, wobei z. B. schwer verdampfbare Oxide und Carbide in leichter verdampfbare Halogenide umgewandelt werden (Kantor, 2001). Die Präsenz von Kohlenstoff im Reaktionsgas verhindert die Freisetzung

³Freon geht auf den Markennamen von Dupont für halogenierte Kohlenwasserstoffe zurück – Fridgen® ist der Markenname von Hoechst hierfür. Für die hier durchgeführten Analysen wurde Dupont™ Freon R22® (CClF₃) eingesetzt.

von Oxiden durch Reduktion zu CO und CO₂ und verlängert die Haltbarkeit des Graphitrohres durch pyrolytische Beschichtung mit Ruß. Zudem treten weniger Ablagerungen im Kunststoffschlauch (z.B. Tygon®, Teflon®) bei der Überführung des Aerosols ins Plasma auf. Dadurch wird die Transporteffizienz von 15 bis 50 % auf 70 bis 100 % erhöht (Friese *et al.*, 2001). Dies ist deutlich höher als bei Zufuhr von flüssigen Proben durch einen konventionellen Zerstäuber. Hier gelangen nur rund 1–10 % der Probe ins Plasma – der Rest wird verworfen. Die genaue Zusammensetzung des ins Plasma injizierten Aerosols ist nicht bekannt, aber es wird von einem Gemisch aus Partikeln, Molekülen und Atomen ausgegangen (Samuel *et al.*, 1996). Durch die Zugabe von Freon wird die Atomisierung des Analyten in der Gasphase allerdings stark unterdrückt (Kantor, 2001). Die Zusammensetzung ist schwer zu untersuchen, da sie sich während des Transports im Zuge der Abkühlung des Dampfes ändert. Bei der Verdampfung von komplexen Materialien wie Pflanzenproben ist zudem nicht vorhersehbar, welche Verbindungen während der Verdampfung entstehen. Vor der Verdampfung von Pflanzenmaterial muss ein Trocknungs- und Veraschungsschritt erfolgen, da es bei zu schneller und zu starker Erhitzung zur Überladung und Auslöschung des Plasmas durch die schlagartig verpuffende Probe kommt. Neben der Verdampfung finden Vorgänge wie Schmelzen, Desolvatisierung und Zersetzung statt. Durch die unterschiedlichen Verdampfungstemperaturen der verschiedensten chemischen Verbindungen findet bei langsamer Temperaturerhöhung eine Art chromatographische Auftrennung der Elemente statt. Die Auflösung dieser »Chromatographie« wird limitiert durch Vermischungsvorgänge während der Überführung ins Plasma. Ein geringer Innendurchmesser des Schlauches und eine hohe Gasflussgeschwindigkeit reduzieren diesen Effekt, führen aber andererseits zu vermehrten Ablagerungen und Kollisionen von Partikeln im Schlauch. Als günstiger Kompromiss haben sich 3–4 mm Innendurchmesser und ein Gasfluss von 0,4–0,8 l min⁻¹ erwiesen (Friese *et al.*, 2001). Idealerweise erreicht jedes zu analysierende Element in *einem* wohl definierten Zeitfenster das Plasma. Hierin liegt der Hauptunterschied zur ICP OES mit flüssigen Proben: Bei letzterer liegt nach dem Probenaufschluss eine relativ kleine Probeneinwaage stark verdünnt in einem großen Volumen vor. Durch den zusätzlichen Transportverlust aufgrund des Zerstäubers ist die Konzentration der Probe im Plasma zu jedem Zeitpunkt sehr gering. Bei der elektrothermalen Verdampfung erreicht in dem kurzen Zeitfenster nahezu die komplette Probe das Plasma. Das untere Detektionslimit ist daher bei der ETV-Kopplung ein bis zwei Größenordnungen niedriger als bei flüssiger Probenezufuhr. Mittels eines *Timescans* kann für jedes Element die Intensitätsänderung der Emissionslinien im Verlauf der Verdampfung (di/dt) visualisiert werden. Anhand dessen wird ein Detektionszeitfenster für jedes Element in der TEVA-Software gesetzt. Die Integration der Fläche unter dieser Intensitätskurve entspricht den CTS, die in diesem Zeitfenster registriert werden. Ausgegeben wird allerdings nicht die Summe der detektierten Intensität, sondern die mittlere Intensität im Zeitfenster. Hierbei ist es problematisch, wenn bei zu langsamer Erhitzung verschiedene chemische Formen eines Elements zu mehr als einem *Peak* führen. Bei der Entwicklung des Heizprogramms wurde dies häufig beobachtet: So wurde z. B. für Schwefel während der

langsamer Erhitzung auf 1000 °C ein *Peak* beobachtet und ein weiterer beim anschließenden Ausglühen des Probengefäßes bei 2300 °C (**Abbildung 5.2**). Bei stufenweiser Erhöhung der Temperatur auf 150 °C, 500 °C, 800 °C und 2300 °C wurden sogar drei *Peaks* beobachtet. Über die Natur der Verbindungen, welche diese *Peaks* hervorrufen, lässt sich ohne genauere Untersuchungen nur spekulieren. Der erste *Peak* könnte auf organisch gebundenen Schwefel zurückgehen, da organische Verbindungen schon bei relativ geringen Temperaturen verdampfen oder sich zersetzen. In der Pflanze ist relativ viel Schwefel organisch gebunden in Form von z. B. Thiolgruppen und Disulfidverbindungen in Proteinen oder in niedermolekularen Verbindungen wie Glutathion, Phytochelatinen und Glucosinolaten. Der beim Temperaturanstieg auf 2300 °C beobachtete *Peak* geht wahrscheinlich auf anorganische Sulfate und Sulfide zurück. Diese schmelzen erst bei viel höheren Temperaturen (z. B. MnSO_4 700 °C, Na_2SO_4 884 °C, MgSO_4 1127 °C, K_2SO_4 1069 °C, CaSO_4 1400 °C, MnS 1610 °C, CdSO_4 1750 °C).⁴ Die genauen Verdampfungstemperaturen sind schwer vorhersagbar: Ohne die Beimischung von Freon zerfallen Sulfate zu den entsprechenden Oxiden ($\text{CaSO}_4 \xrightarrow{>800\text{ °C}} \text{CaO} + \text{SO}_3 \rightleftharpoons \text{CaO} + \text{SO}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2$). Die tatsächliche Dissoziations-temperatur ist abhängig vom SO_3 -Partialdruck im Graphitrohr.

Da viele Metalloxide aufgrund der sehr hohen Verdampfungstemperaturen (Schmelztemperatur von CaO 2587 °C) mit der ETV nicht verdampfbar sind, soll durch die Halogenierung idealerweise die Bildung von Oxiden vermieden werden. Metallhalogenide haben deutlich niedrigere Verdampfungstemperaturen als die Oxide (z. B. $\text{CaCl}_2 \approx 1700$ °C). Der beim Temperaturanstieg von 500 °C auf 800 °C auftretende Schwefel-*Peak* in **Abbildung 5.2** geht wahrscheinlich ebenfalls auf eine anorganische Schwefelverbindung mit relativ niedriger Verdampfungstemperatur zurück. Eine Möglichkeit um diesen Annahmen nachzugehen wäre der Vergleich des beobachteten Profils mit den Temperaturprofilen von Standardsubstanzen. Allerdings wäre dies mit einer großen Unsicherheit behaftet, da hierbei die sehr komplexe Matrix des pflanzlichen Gewebes fehlen würde. Dieses Problem könnte reduziert werden, indem eine Pflanzenprobe mit Standardsubstanzen gezielt »kontaminiert« wird und die relativen Änderungen der *Peaks* untersucht werden. Problematisch sind diese verschiedenen chemischen Verbindungen eines Elements bei der Bestimmung des Gesamtgehaltes dieses Elements in der Pflanze, da hierfür die Fläche aller *Peaks* integriert werden muss. Liegen diese zeitlich weit auseinander, führt dies zu einem sehr niedrigen Signal, da dieses – wie oben erwähnt – als Mittelwert der *Counts* im gesetzten Zeitfenster angegeben wird. Die Beschränkung auf die Integration von nur einem *Peak* bei der

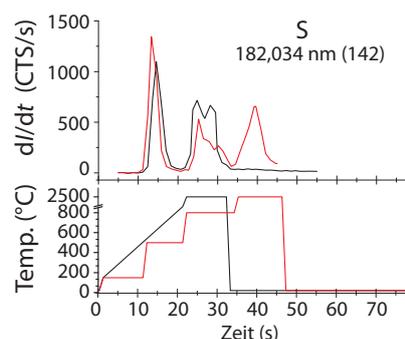


Abb. 5.2: Multiple transiente Signale für Schwefel bei der Verdampfung von Pflanzenmaterial (oben) in Abhängigkeit von Heizprogrammen (unten). Für Details siehe **ABBILDUNG 5.5**.

⁴Manche Sulfide sublimieren ohne zu schmelzen: ZnS 1180 °C, CdS 1000 °C.

Kalibration mit einem Referenzmaterial sowie bei den Proben ist aus zwei Gründen keine Alternative: Zum ersten entspricht dieser *Peak* nicht dem zertifizierten Gesamtgehalt dieses Elements im CRM. Zweiten unterscheidet sich das Pflanzenmaterial des Kalibrationsstandards zumeist vom Material der zu analysierenden Proben. **Abbildung 5.3** und **5.5** deuten darauf hin, dass die Verhältnisse der *Peaks*

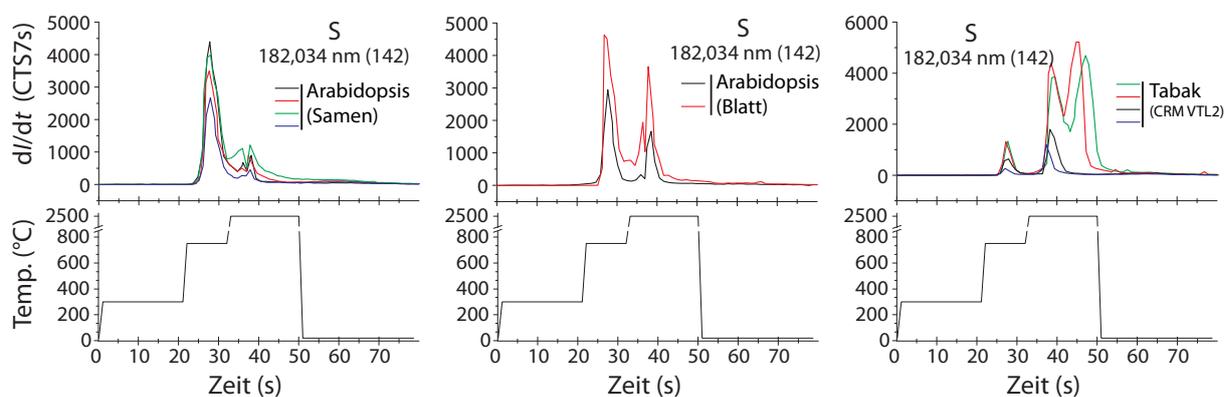


Abb. 5.3: Das Verdampfungsprofil von Schwefel ist abhängig vom Pflanzenmaterial. Im unteren Teil des Diagramms ist die Temperaturvorgabe der ETV dargestellt (Heizprogramm). Die zwei transienten Schwefelsignale bei der Verdampfung von Schwefel gehen vermutlich auf organischen gebundenen Schwefel (bei ≈ 28 s / 750 °C) und anorganischen Schwefel (bei ≈ 38 s / 2500 °C) zurück. Das Verhältnis der zwei *Peaks* unterscheidet sich bei unterschiedlichen Pflanzenmaterialien.

zueinander bei unterschiedlichen Pflanzenmaterialien variieren. Eine genaue Aussage über die Verhältnisse der *Peaks* zueinander ist anhand der *Timescans* nicht möglich: Die Auslesefrequenz der Pixel des CID-Chips lag bei den dargestellten *Timescans* deutlich unter der Auslesefrequenz im Analysemodus. Bei extrem starken Intensitätsanstiegen kommt es hierdurch zu Artefakten. Aufgrund der erwähnten Probleme wurde angestrebt, ein Temperaturprogramm zu entwickeln, bei dem jedes Element nur einen *Peak* hervorruft. Wurde die Temperatur direkt nach einer Veraschungsphase von 30 s Dauer bei 300 °C auf >1000 °C erhöht, kam es bereits bei sehr geringen Einwaagen von ≈ 500 ng zum Erlöschen des Plasmas. Dies geht auf einen übermäßigen Energieentzug zurück, was als Überladung bezeichnet wird. Werden große Probenmengen schlagartig verdampft, kommt es zu einer hohen Elementkonzentration im Plasma. Die Atomisierung, Ionisierung und Anregung der Elemente entzieht hierbei viel Energie. Zudem kann es zum Mitreißen von Partikeln beim schlagartigen Verpuffen der Probe nach unzureichender Veraschung kommen. Bei Probenmengen, die zum »Flackern« des Plasmas führen, wird bei einigen Elementen eine scheinbare geringere Konzentration festgestellt als bei niedrigeren Probenmengen. Dies liegt an unzureichender Anregung der Elemente durch das zu kühle Plasma. Auch beim zuvor erwähnten Programm mit langsamer Erhöhung auf 1000 °C vor dem Ausglühen (**Abbildung 5.2**) kam es bei Einwaagen >1 mg häufig zur Überladung des Plasmas. Im Fall des zweiten in dieser Abbildung dargestellten Programms mit Temperaturerhöhung in vier Stufen auf 2500 °C (jeweils ≈ 10 s bei 150, 500 und 800 °C) konnten bis zu 3,5 mg Pflanzenmaterial verdampft werden. Allerdings war Schwefel aufgrund der drei auftretenden *Peaks* nicht quantifizierbar. Beim letztendlich gewählten Temperatur-

programm wird die Probe zunächst 20 s auf 300 °C erhitzt. Dies gewährleistet ausreichende Trocknung und teilweise Veraschung des Pflanzenmaterials, ohne dass während dieser Phase eine Schwefel-form verdampft. Daraufhin folgt ein zweiter Veraschungsschritt bei 750 °C, der mit 10 s relativ kurz gewählt wurde. Die Verdampfung aller Elemente erfolgt durch Erhitzung auf 2500 °C für 17 s. Dieses Programm erlaubt die Analyse von relativ großen Einwaagen bis 2,5 mg und führt nur bei wenigen Elementen zu zwei *Peaks*. Diese liegen dicht beieinander, weshalb die Fläche unter beiden *Peaks* zusammenfassend integriert werden kann. Zu den Elementen, für die zwei *Peaks* detektiert wurden, gehören Cu und Ca. Bei diesen Elementen trat der zusätzliche *Peak* aber nicht während der Veraschungsphase bei 800 °C auf. Vielmehr kam es bei Ca nach der Erhöhung der Temperatur auf 2500 °C zu einem scharfen *Peak*, dem ein zweiter folgte, der sich weit in die Abkühlungsphase hinein erstreckte. Für Cu trat der zweite *Peak* sogar *nach* dem 2500 °C-Ausglühschritt auf. In **Abbildung 5.4** ist das Ergebnis

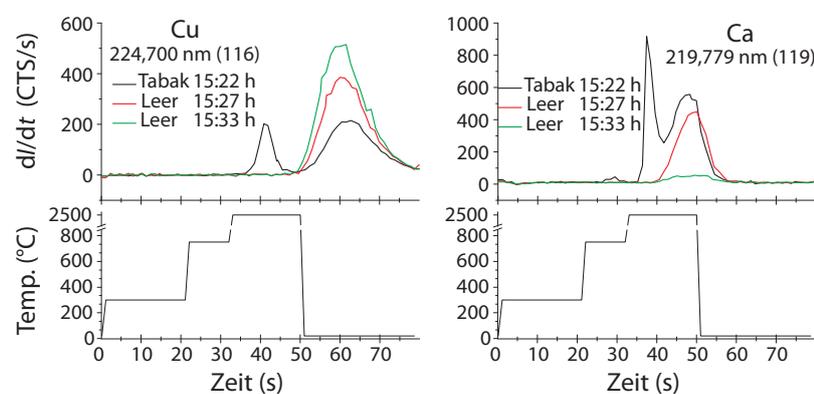


Abb. 5.4: Artefakt-Signale für Cu und Ca bei der Verdampfung von Pflanzenmaterial. Bei drei direkt aufeinanderfolgenden Verdampfungen wurde dasselbe Probengefäß verwendet. Nur bei der ersten Verdampfung erfolgte die Einwaage von Pflanzenmaterial. Für beide Elemente wurde auch bei leerem Probengefäß ein zweiter *Peak* beobachtet. Die Intensität dieses *Peaks* nahm für Cu im Laufe der Messungen zu und für Ca ab.

dreier Verdampfungen mit demselben Graphittiegel dargestellt, wobei nur bei der ersten Verdampfung die Einwaage von Pflanzenmaterial erfolgte. Der zweite bei Ca auftretende *Peak* wurde hierbei auch beim leeren Graphittiegel beobachtet, nahm aber von Experiment zu Experiment ab. Für Cu nahm die Intensität dieses zweiten *Peaks* hingegen bei den drei direkt aufeinanderfolgenden Verdampfungen zu. Im Fall von Ca bildet sich sehr wahrscheinlich bei der Probenverdampfung das Carbide CaC_2 ($\text{CaO} + 3\text{C} \xrightarrow{>1600\text{ °C}} \text{CaC}_2 + \text{CO}$), das bei 2300 °C schmilzt und sich erst bei 2500 °C zersetzt. CaC wird technisch in riesigen Mengen im *Carbidofen* unter fast identischen Bedingungen hergestellt. Zur Bildung von CaO sollte es allerdings durch die Beimengung von $2\text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Freon zum Argonfluss von $0,8\text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ nicht kommen. Prell *et al.* (1991) stellten für die Bildung von CaC einen Mechanismus vor, der mittels der Quantentheorie von Festkörpern zu erklären ist: Das bei zunehmender Temperatur vermehrt freigesetzte elementare Ca lagert sich gemäß dieser Theorie an den Kohlenstoff des Graphitrohr-Ofens durch Wechselwirkung der bei diesen Temperaturen bereits angeregten Ca-Elektronen mit der Elektronenband-Struktur des Kohlenstoffs an. Im angelagerten Zustand bildet sich durch Änderung der Elektronenkonfiguration zwischen dem Adsorbant Ca und dem Adsorbent C das Carbide, welches angelagert bleibt und nur langsam desorbiert. Ca ist mit K eines der häufigsten Elemente in der Pflan-

ze. Die erste Verdampfungsphase von 17 s Dauer bei 2500 °C reicht hierbei offensichtlich nicht aus um alles CaC zu verdampfen, weshalb es zu einem »Mitschleppeffekt« kommt. Die Ausdehnung des *Peaks* bis in die Abkühlphase hinein deutet auf kontinuierliche Chlorierung von CaC hin: Solange die Temperatur über 1600 °C liegt, würde CaCl₂ verdampfen – aber nicht CaC. In **Abbildung 5.4** ist zu erkennen, dass nach zweimaligem »Ausbrennen« des Probengefäßes kein Signal für Ca mehr detektiert werden konnte. Es wurde bisher nicht getestet, ob durch die Erhöhung der Freonmenge dieser zweite *Peak* bei Ca unterdrückt werden kann. Eine Erhöhung der Freonflusses birgt die Gefahr der pyrolytischen Beschichtung der Probe mit einer schützenden unreaktiven Kohlenstoffschicht (Hamier und Salin, 1998). Neben dem Umstand, dass aufgrund der CaC-Bildung Ca nicht korrekt quantifiziert werden kann, trägt die Bildung des Carbids durch Anlagerung an das Graphit des Ofens auch zur schnelleren Alterung des Graphitrohres durch »Korrosion« bei. Dies ist ein bekannter Nachteil bei der Zugabe von chemischen Modifizierern wie CaCl₂ oder LaCl₂ zum Analyten (Welz *et al.*, 1986). Die Haltbarkeit des Graphitheizrohres ist mit 70 bis 200 Messungen schon relativ gering. Für VaCl₄ und CrCl₃ wurde gezeigt, dass bei Temperaturen über 2300 °C die Dissoziation der Chloride deren Bildung überschreitet, mit einhergehender Restauration der Carbidbildung (Matousek und Powell, 1986). Möglicherweise kann das Problem des zweiten *Peaks* für Ca in zukünftigen Versuchen gelöst werden, indem die Temperatur des Verdampfungsschrittes von 2500 °C auf ≈ 2300 °C gesenkt wird. Wird diese Phase zudem verlängert, kann eventuell durch die effektivere Chlorierung alles Ca in einem Ausheizschritt verdampft werden. Die Reduktion der Temperatur könnte auch das zweite Problem lösen: Für Cu wird angenommen, dass der zweite *Peak* auf Kontamination aus dem Gerät zurückgeht, die mit steigender Erwärmung der Apparatur zunimmt. In **Abbildung 5.5** sind die *Timescans* für alle Elemente dargestellt, die mit der entwickelten Methode gemessen werden. Für Cd, Fe, Na und Pb wird wie bei Schwefel vor dem Verdampfungsschritt bei 2500 °C ein zweiter *Peak* während der Veraschungsphase bei 750 °C beobachtet. Hierbei liegen offensichtlich Metall-Schwefel-Verbindungen mit niedrigen Verdampfungstemperaturen vor, möglicherweise in Form von Komplexen dieser Metalle mit den schwefelhaltigen organischen Komplexbildnern wie Phytochelatinen.

Erschwerend bei der Analyse der Zeitabhängigkeiten der Verdampfung für die Entwicklung des optimalen Temperaturprogramms war der erst sehr spät entdeckte Umstand, dass die TEVA-Software die erste Ableitung der Intensität dI/dt meist fehlerhaft berechnet (**Abbildung 5.6**). Die von der Software angezeigten *Peaks* sehen häufig wie in dieser Abbildung aus und verschwinden bei sehr abrupten Änderungen der Intensität komplett. Für die Neuberechnung und Darstellung der Zeitabhängigkeiten wurde daher ein zusätzliches Origin[®]-*Plugin* programmiert, mit dem die Analyse nach Export der Rohdaten extern erfolgen kann. Die in dieser Arbeit dargestellten Inten-

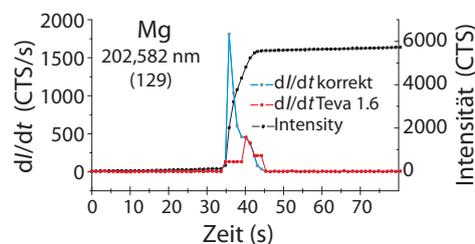


Abb. 5.6: Timescanbug der TEVA Software.

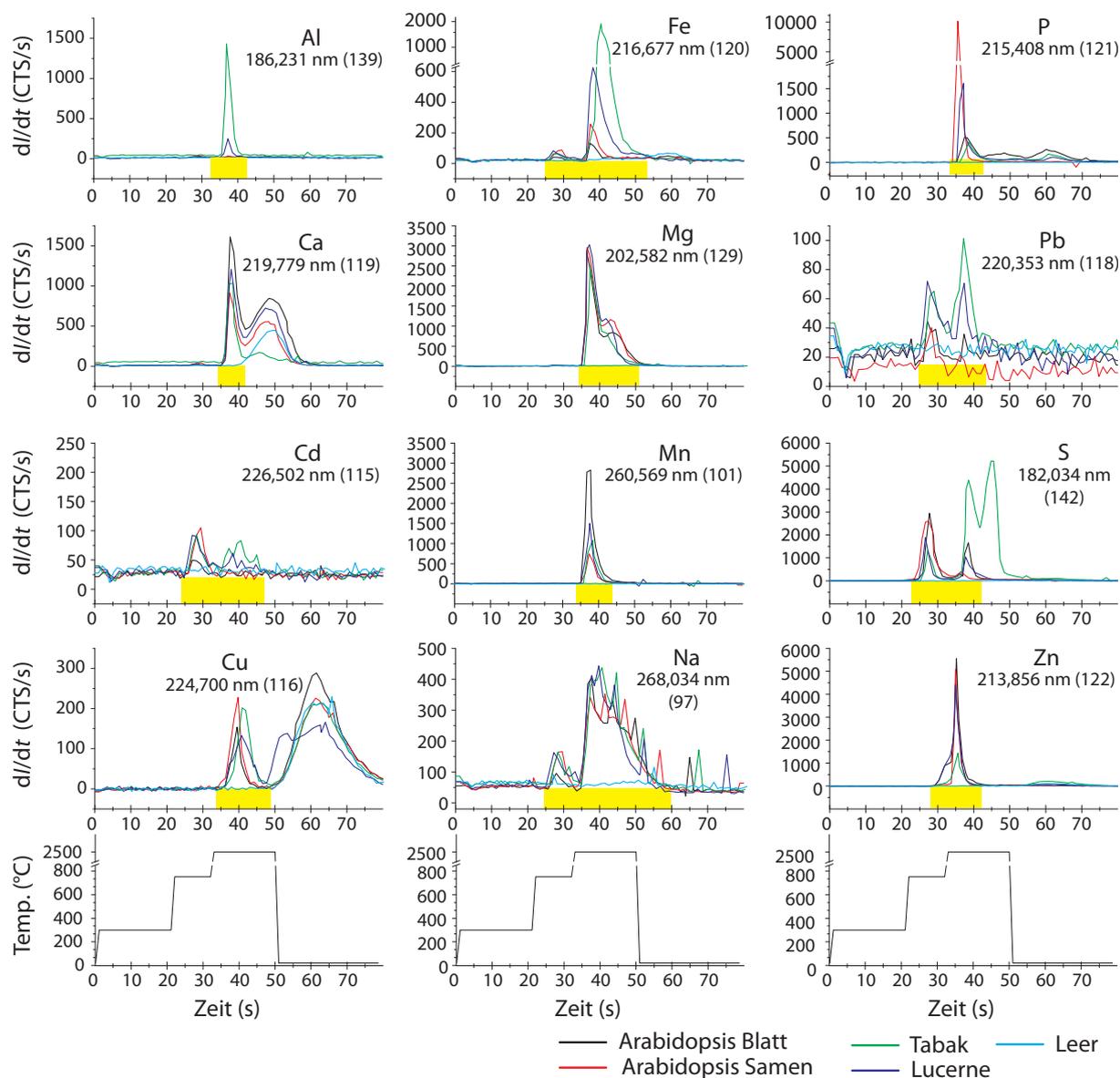


Abb. 5.5: Temperaturprogramm zur Verdampfung von Pflanzenmaterial und Detektionszeiten der Elemente. Die im unteren Teil dargestellte Temperatur ist die Vorgabe der ETV (Heizprogramm). Das Graphitrohr folgt der Vorgabe einer Temperaturerhöhung um 1000 °C mit $\approx 2\text{--}3$ s Verzögerung. Die erste Phase von 20 s Dauer bei 300 °C dient der Trocknung und teilweisen Veraschung des Pflanzenmaterials. Veraschung erfolgt durch Erhitzung auf 750 °C für 10 s. Für die Verdampfung der Elemente wird anschließend für 17 s auf 2500 °C erhitzt. Die Abkühlung von 2500 °C auf ≈ 100 °C dauert beim verwendeten Wasserkreislauf-Kühlsystem 1:30 min. Dargestellt ist für die angegebenen Emissionslinien die Intensitätsänderung dI/dt , die von der ICP OES nach dem Start der Messungen im *Timescan* Modus detektiert wurde. Zusätzlich zu der Wellenlänge, wurde die gerätespezifische Brechungsordnung angegeben, bei der diese Wellenlänge gemessen wurde. Mithilfe dieser *Timescans* werden die gelb dargestellt Zeitfenster gesetzt. Für die Messung von Proben im Quantifizierungsmodus wird durch die TEVA-Software für jedes Element die mittlere Intensität in diesem Zeitfenster in $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ angegeben.

sität-Zeit-Diagramme wurden alle extern mit dieser Softwareerweiterung in Origin® berechnet und repräsentieren somit *nicht* die Ausgabe der TEVA-Software. Genauere Untersuchung des Fehlers ergab, dass für den Zeitraum starker Intensitätsänderungen der korrekt berechnete Wert am Anfang der Änderung für alle folgenden Werte lediglich kopiert wird. Dies betrifft auch die Ableitungen der Intensität von Pixeln, die für die Hintergrundkorrektur verwendet werden (Abschnitt 5.2.1) – obwohl bei diesen naturgemäß keine großen Intensitätsänderungen auftreten.

5.2.3 Methodik zur automatisierten Messung von fünfzig Proben

Wie zuvor erwähnt, ist die TEVA-Software nicht in der Lage, die im *Autosampler* gespeicherten Einwaagen der Proben zu lesen und mit den Daten der ICP OES zu verknüpfen. Die vom *Autosampler* an den seriellen Port des Kontrollcomputers der ICP OES übermittelten Einwaagen werden daher mit einem separaten Terminalprogramm empfangen und in einer ASCII-Datei gespeichert. Die Einwaage der bis zu fünfzig Proben geschieht am *Autosampler* mit Hilfe der integrierten Feinwaage. Daraufhin wird der Kontrollcomputer der ICP OES in den oben beschriebenen Modus für kontinuierliche Messung versetzt. In diesem Modus wird immer dann eine Messung gestartet, wenn der Kontrollcomputer der ETV ein Signal gibt. Die sequenzielle automatische Analyse der Proben wird am *Autosampler* gestartet. Dieser platziert die eingewogenen Proben im Graphitrohr-Ofen. Dieser Vorgang startet über den zuvor beschriebenen *Handshake*-Mechanismus eine Messung mit der ICP OES. Wenn alle fünfzig Proben gemessen wurden, wird mit der TEVA-Software eine EXCEL Tabelle exportiert, in der für jede gemessene Emissionslinie die Rohdaten ($\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$) aller Proben aufgelistet sind. Innerhalb der TEVA-Software wird keinerlei Auswertung durchgeführt, weshalb Kalibrationsdaten genauso wie normale Proben analysiert werden.

5.3 Erweiterung für Origin® v7.0 und v7.5

ORIGIN ist ein Programm zur Erstellung von wissenschaftlichen Graphen und zur Datenanalyse. Zur automatisierten Steuerung der Software bietet es die proprietäre Skriptsprache LABTALK. Seit der Version 7.0 unterstützt es zusätzlich die komplette Syntax von ANSI-C sowie einige C++ und C# Merkmale. Hiermit ist die Grundlage gegeben, ORIGIN® an die eigenen Bedürfnisse anzupassen. Dabei kann auf alle verfügbaren Funktionen zur Manipulation und Analyse der Daten sowie zur Erstellung von Graphen zurückgegriffen werden.

5.3.1 Funktionalität

Für die Auswertung der Rohdaten der ETV-ICP OES Analytik wurde die im Folgenden vorgestellte Softwareerweiterung für Origin® in ANSI-C programmiert. Das *Plugin* »EIODA.opk« ist in die

PDF-Datei dieser Arbeit eingebettet und kann – insofern mindestens ORIGIN v7.0 installiert ist – durch Doppelklick auf das Symbol am Seitenrand installiert werden. Hierdurch erscheint in ORIGIN eine neue Werkzeugleiste mit sechs *Buttons*, welche die folgende Funktionalität bieten:⁵



- Kalibrationsdaten laden
- Kalibrationsdaten fitten⁶ (zwei alternative *Buttons*)
- ETV-Messungen laden und Elementkonzentrationen berechnen (zwei alternative *Buttons*)
- Auswertung und graphische Darstellung aller Messungen

Technische Wiederholungen werden beim Laden der Messungen automatisch erkannt, insofern die Proben dieselbe Bezeichnung haben. Alternativ kann der Anwender technische Wiederholungen manuell eingeben. Hierdurch werden standardmässig Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und graphisch dargestellt. Vor dem Laden von neuen Messungen können neue Kalibrationsdaten geladen werden. Die Berechnung der Elementkonzentrationen von neu geladenen Messungen wird immer auf Grundlage des zuletzt durchgeführten Fits der Kalibrationsdaten durchgeführt. Dies erlaubt in einem Projekt die zusammenfassende Auswertung und Darstellung von Experimenten, die sich über viele Tage erstrecken. Hierdurch ist es möglich, bei großen Experimenten mit hunderten oder tausenden von Proben – wie einem Screen auf den Elementgehalt von Individuen einer EMS-mutagenisierten Population – in wenigen Minuten einen Überblick über das gesamte Experiment zu erhalten. Die einzelnen Funktionen und was bei der Analyse der Daten zu beachten ist, wird im Folgenden genauer beschrieben.

Import der Kalibrationsdaten Um Messungen zu analysieren, müssen zunächst die Parameter von Regressionsfunktionen berechnet werden, welche die Abhängigkeit zwischen den Elementkonzentrationen und den gemessenen Signalen der Emissionslinien beschreiben. Hierfür werden drei Datenquellen vom Programm in einer Tabelle zusammengefasst: Zum ersten sind dies die Einwaagen des Kalibrationsmaterials. Diese ASCII-Datei wird – wie oben erwähnt – von einem Terminalprogramm geschrieben, welches die Gewichte bei der Einwaage am *Autosampler* empfängt. Die zweite Datenquelle ist eine ASCII-Datei, welche die elementare Zusammensetzung des Kalibrationsstandards enthält. Die dritte Datenquelle ist eine EXCEL-Datei, welche in chronologischer Reihenfolge die Rohdaten der gemessenen Elemente enthält. Die Tabelle wird mit dem TEVA Report Manager als *Horizontal Table Report* exportiert. Sie sollte der Nomenklatur »Bezeichnung.r.xls« folgen, wobei den dazugehörigen Einwaagen dieselbe Bezeichnung mit der Erweiterung »*.rwe« gegeben werden sollte. Dies ermög-

⁵Die Funktion der Buttons wird angezeigt, wenn der Mauszeiger über ihnen schwebt. Beispieldaten aus dieser Arbeit werden bei der Installation des Pakets unter 'C:\ETV-Auswertung Beispiel' gespeichert und können z. B. mit der Demoversion (<http://www.originlab.com>) analysiert werden.

⁶Um Missverständnisse zu vermeiden, wird in dieser Arbeit statt »Anpassung« oder »Ausgleichskurve« das englische Wort *Fit* verwendet.

licht, dass beim Laden der EXCEL-Tabelle die zugehörigen Einwaagen automatisch gefunden und geladen werden. Werden die Einwaagen nicht gefunden, erfolgt eine Abfrage. Zudem wird der Anwender aufgefordert, die Datei anzugeben, welche die Zusammensetzung des Kalibrationsmaterials enthält. Es werden nur die Emissionslinien von Elementen geladen, für die ein Wert in dieser Datei existiert. Alle anderen Linien werden ignoriert. Im ORIGIN®-Projekt werden zwei Ordner angelegt, welche die geladenen Daten bzw. die Graphen für alle geladenen Emissionslinien enthalten.

Fit der Kalibrationsdaten Idealerweise herrscht ein direkter linearer Zusammenhang zwischen der Intensität I_{ij} einer Emissionslinie und der Konzentration c der Atome im Plasma (Heckmann und Träbert (1989), Gleichung (5.1)):

$$I_{ij} = \beta \cdot c. \quad (5.1)$$

I_{ij} steht hierbei für die Intensität, die beim Übergang eines Elektrons vom Energielevel i zum Energielevel j . Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Übergang A_{ij} verbirgt sich hierbei im Factor β :

$$\beta = \alpha A_{ij} \frac{g_i}{g_0} h \nu_{ij} e^{-E_i/(kT)}. \quad (5.2)$$

Hierbei sind g_i und g_0 statistische Gewichte für den angeregten bzw. Grundzustand, h ist die Planck-Konstante, ν_{ij} die Frequenz des Übergangs, E_i ist das Anregungspotential des Atoms, k die Boltzmann-Konstante, T die absolute Temperatur und α ist das Verhältnis der Atomdichte im Plasma zur Elementkonzentration in der Probe. Tatsächlich kommt es aber bei steigenden Atomkonzentrationen im Plasma zur Selbstabsorption. Durch die Einführung des zusätzlichen Faktors b in Gleichung (5.1) zur Berücksichtigung dieses Umstandes erhält man die Scheibe-Lomakin-Funktion – die Grundfunktion der quantitativen Spektroskopie:

$$I_{ij} = \beta \cdot c^b. \quad (5.3)$$

Der Bereich, in dem die Kurve annähernd linear ist, wird als »dynamischer Umfang« bezeichnet. Er kann bei der ICP OES bis zu vier Größenordnungen umfassen und ist für die ICP-MS sogar noch etwas größer. Aufgrund der in **Abschnitt 5.1.1** erwähnten Limitierung bezüglich der Auslesefrequenz der einzelnen Linien im Modus für transiente Signale ist der dynamische Umfang bei Kopplung mit der ETV etwas niedriger. Im Gegensatz zum bisher Erörterten liegen im Plasma hauptsächlich Ionen und keine Atome vor. Die Scheibe-Lomakin Funktion zur Berechnung der absoluten Intensitäten gilt – mit einem modifizierten Term (5.2) – auch für angeregte Ionen. Zum Fit der Graphen wurde daher zunächst die Scheibe-Lomakin-Funktion mit einem zusätzlichen *Offset*-Term a implementiert:⁷

$$I = f(c) = \beta \cdot c^b + a. \quad (5.4)$$

⁷Im Folgenden wird I am Sinne von I_{ij} verwendet.

Die Konzentrationen c können hiermit aus den Intensitäten I durch die Umkehrfunktion

$$c = f^{-1}(I) = \left(\frac{I - a}{\beta} \right)^{\frac{1}{b}} \quad (5.5)$$

berechnet werden. Die Funktion (5.4) kann sehr gut an die Kalibrationsdaten angepasst werden. Allerdings kam es aufgrund von Ausreißern im oberen Kalibrationsbereich bei Cd und Pb häufig zu Anpassungen, die statt Sättigungskurven zur Signalachse gebogene Kurven beschreiben. Solche Kurven können durchaus der Realität entsprechen, wenn es mit zunehmender Probeneinwaage zu einer steigenden Transporteffizienz kommt (Kantor und de Loos-Vollebregt, 2005). Dies wurde jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die Transporteffizienz bei der Zugabe des Reaktionsgases Freon – auch schon bei niedrigen Probeneinwaagen – sehr hoch ist (siehe **Abschnitt 5.2.2**). Ausreißer im unteren Kalibrationsbereich führten bei Anpassungen mit der Funktion (5.4) ebenfalls zu Kurvenverläufen, die einen exponentiellen Anstieg anstatt einer Sättigung beschreiben. Weiterhin verlaufen die Kurven bei gekrümmtem Verlauf in manchen Fällen oberhalb des letzten Kalibrationswertes. Dies entspricht rein optisch nicht der Sättigung, die aufgrund der gemessenen Kalibrationswerte erwartet wird. Aufgrund dieser Probleme wurde als alternative Sättigungsfunktion die Hyperbelfunktion (5.6) implementiert:

$$I = f(c) = \frac{A \cdot c}{c + k} + b. \quad (5.6)$$

Diese Funktion unterscheidet sich von der klassischen Hyperbelfunktion durch den zusätzlichen *Offset*-Parameter b . Dies ermöglicht die präzisere Anpassung an Kurven solcher Emissionslinien, die bei 0 ng Einwaage schon eine gewisse Intensität zeigen. Beobachtet wurde dies nur für Na. Die Berechnung der Elementkonzentrationen erfolgte in diesem Fall durch die Umkehrfunktion

$$c = f^{-1}(I) = \frac{k(I - b)}{A - I + b}. \quad (5.7)$$

Vor dem Fit der Kalibrationsdaten kann der Anwender offensichtliche Ausreißer maskieren, wodurch die oben erwähnten Probleme bei Anpassungen mit der Funktion (5.4) größtenteils vermieden werden können. Die Maskierung geschieht durch Selektion der Ausreißer mit dem Maskierungswerkzeug im Graphen. Diese Punkte werden beim Fit nicht berücksichtigt. Da die Hyperbelfunktion insbesondere bei unmaskierten Ausreißern, robustere Ergebnisse lieferte wurde die Auswertung standardmäßig hiermit durchgeführt. Allerdings unterscheiden sich beide Funktionen nach der Maskierung von Ausreißern zumeist nur sehr marginal. In **Abbildung 5.7** sind für jedes Element Kalibrationsdaten sowie Kurven dargestellt, die durch Fits mit den Funktionen (5.4) und (5.6) erhalten wurden. Die Diagramme werden durch das *Plugin* generiert, wobei Emissionslinien mit ähnlichen X- und Y-Achsen in einem

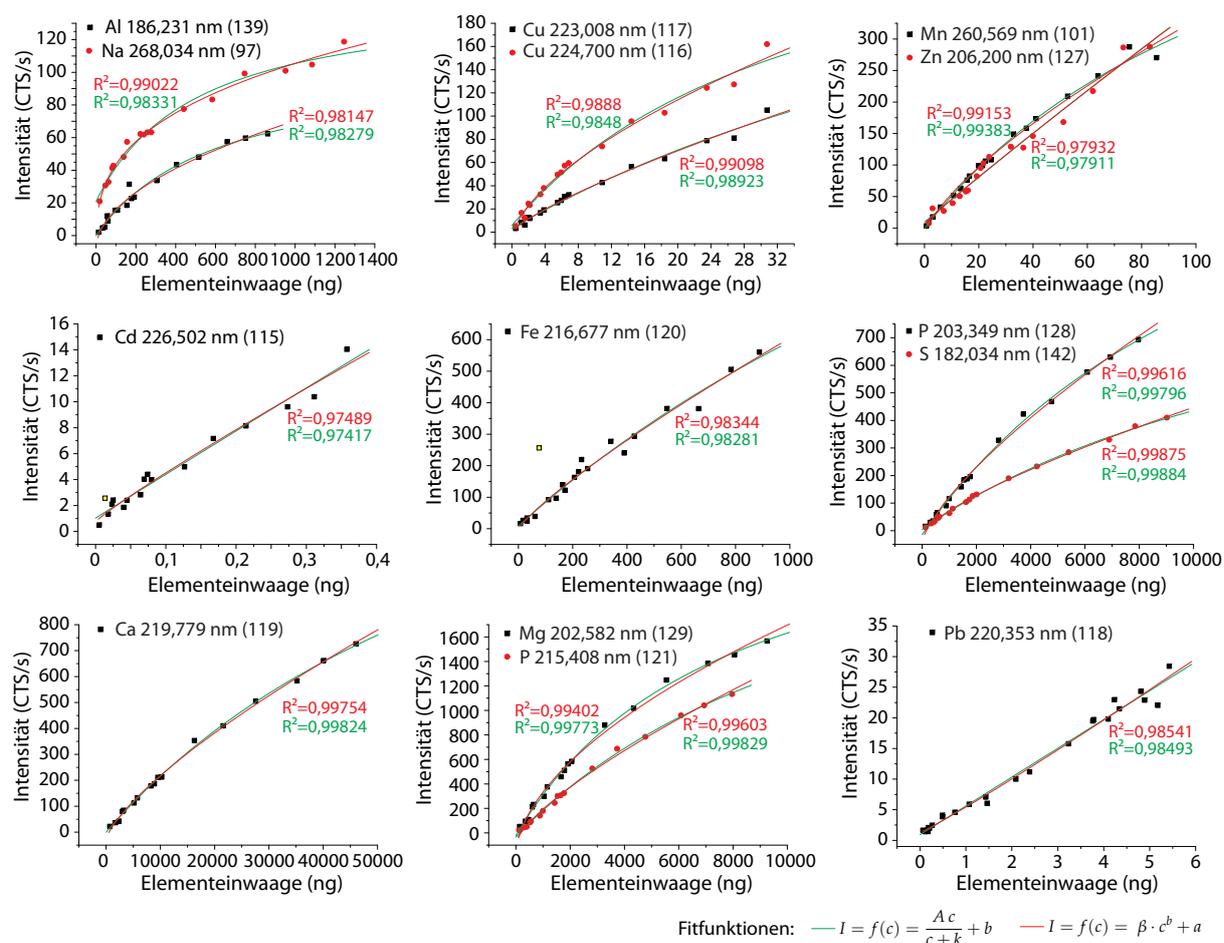


Abb. 5.7: Kalibration der ETV-Methode mit CRM. Die Rohdaten werden durch die Analyse von CRM mit der ETV-ICP OES erhalten. Diese werden wie im Text beschrieben mit dem *Plugin* für ORIGIN® importiert und gefittet. Hierdurch werden die dargestellten Diagramme erhalten sowie die Parameter der Fitkurven generiert. Mit diesen werden nach Import von Messungen die Elementkonzentrationen berechnet. Durch den allometrischen Fit (rote Kurven) und durch die Hyperbelfunktion (grüne Kurven) werde nahezu identische Anpassungen an die Daten erhalten. Der Verlauf der Hyperbel bei hohen Elementkonzentrationen über den kalibrierten Bereich hinaus entspricht häufig eher der Erwartung (Al, Ca, Mg, P, S). Die maskierten Datenpunkte sind gelb hervorgehoben.

Diagramm gruppiert werden. Es wurde in der Abbildung pro Element jeweils nur eine Emissionslinie dargestellt, obwohl standardmäßig alle in **Tabelle 5.1** aufgelisteten Linien gemessen werden. Die alternativen Emissionslinien ergeben identische Kurvenverläufe, die sich nur in den gemessenen $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ unterscheiden. Vom Programm werden in einer Tabelle für die generierten Fits alle Parameter, deren Fehler, sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 und die minimierte Prüfgröße χ^2 gespeichert. Sollten anhand der Kurven oder dieser Parameter fehlerhafte Fits erkannt werden, ist erneutes Fitten nach dem Maskieren problematischer Datenpunkte möglich, bevor Messungen geladen werden. Die Funktionalität zum Fit der Daten mit der allometrischen Funktion (5.4) und der Berechnung der Elementkonzentrationen mit ihrer Umkehrfunktion wurde im Programm belassen und kann jederzeit als Alternative

benutzt werden. In **Abbildung 5.7** ist zu erkennen, dass für Al, Ca, Mg, und P der Verlauf der Hyperbel bei hohen Elementkonzentrationen über den kalibrierten Bereich hinaus eher der Erwartung entspricht. Häufig wird dies auch für Schwefel beobachtet. Treten bei Messungen $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ im oberen Kalibrationsbereich und darüber hinaus auf, liefert die Hyperbelfunktion demnach akkuratere Ergebnisse.

Laden von Messungen Das Laden der Rohdaten in das Projekt geschieht analog zum Laden der Kalibrationsdaten. Insofern bei der Benennung der beiden benötigten Dateien die Nomenklatur »Bezeichnung.s.xls« für ICP OES-Rohdaten und »Bezeichnung.swe« für die Probeneinwaagen eingehalten wird, erfolgt – wie beim Laden der Kalibrationsdaten – eine automatische Zuordnung der Einwaagen zu den ICP OES-Daten. Die Elementkonzentrationen der Proben werden beim Laden auf Grundlage der Fits mit der Umkehrfunktion (5.7) der Hyperbelfunktion in *parts per million* (ppm) berechnet. Sollen die Elementkonzentrationen auf Grundlage der Parameter der Scheibe-Lomakin-Funktion mit deren Umkehrfunktion (5.5) berechnet werden, müssen die Daten mit der entsprechenden Importfunktion geladen werden. In diesem Fall werden die Elementkonzentrationen nur für Proben berechnet, deren $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ im Kalibrationsbereich liegen. Für die Hyperbelfunktion erfolgt die Berechnung in einem um den Faktor 1,5 erweiterten Bereich. Auch wenn nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Fitkurven diesen Bereich oberhalb des maximalen Kalibrationswertes korrekt beschreiben, erlaubt dies zumindest den Vergleich ungefährender Elementkonzentrationen von Proben, die in diesem Bereich gemessen werden. Die Scheibe-Lomakin-Funktion folgt in diesem Bereich dem erwarteten weiteren Verlauf der Kalibrationsdaten zumeist schlechter (siehe oben). Werden beim Laden der Messungen technische Wiederholungen von Messungen derselben Probe auf Grundlage identischer Probenbezeichnungen nicht erkannt, können diese interaktiv manuell eingegeben werden.

Auswertung der geladenen Messungen Bei Wahl dieser Funktion werden alle geladenen Messungen in einer Tabelle zusammengefasst. Insofern technische Wiederholungen von Messungen derselben Probe vorliegen, wird für diese der Mittelwert und die Standardabweichung der Konzentration (ppm) berechnet. Bei der daraufhin folgenden graphischen Darstellung dieser Tabelle werden wahlweise alle Emissionslinien eines Elements in einem Diagramm zusammengefasst oder in je einem Diagramm dargestellt. Zur Einschätzung der Verlässlichkeit der berechneten Werte erfolgt in jedem Diagramm eine Gegenüberstellung des kalibrierten Bereichs mit dem Bereich der $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$, die für die Proben gemessen wurden. Für die Proben wird hierbei ein Boxplot dargestellt: Die Box reicht vom 25 % bis zum 75 %-Quantil der Daten. Zudem wird der minimale und der maximale gemessene Wert als Endpunkte der vertikalen Linien (*whiskers*) dargestellt. Idealerweise sollte diese Box mittig im (linearen) Kalibrationsbereich liegen.

5.3.2 Vergleich des Elementgehalts von Samen von 35 *Arabidopsis*-Ökotypen

Um die entwickelte Methode der ETV-ICP OES-Kopplung zu testen, wurden Elementgehalte im Samen von 50 *Arabidopsis*-Ökotypen mit je drei technischen Wiederholungen gemessen (**Abbildung 5.8**). Die Daten von 15 Ökotypen mussten verworfen werden, da ein verschlissenes Graphitheizrohr im Verlauf der Messung zum kontinuierlichen Ansteigen der Messwerte und Standardabweichungen führte. Die Ökotypen wurden nach geographischer Herkunft ausgewählt. Eine kurze Beschreibung sowie Bilder der Pflanzen sind auf den Webseiten von ABRC⁸ und NASC⁹ zu finden. Als limitierender Faktor für den Probendurchsatz stellte sich die Haltbarkeit des Graphitheizrohres heraus. Im Regelfall war das Rohr nach nur rund 70 Messungen durchgebrannt. Die Lebensdauer des Graphitrohres reicht somit gerade für die Lokalisation der Elemente auf dem CID-Chip (»Mapping«), die Kalibration und die Analyse von 15 Proben mit je drei Wiederholungen. Die Einwaage der Proben am *Autosampler* in einen 50-fach Probenteller und die automatische Analyse dauert rund anderthalb Stunden. Ohne Wechsel des Graphitrohres sind somit ≈ 70 Proben mit drei technischen Wiederholungen an einem Tag messbar. Aufgrund des Zeitverlustes beim Einbau eines neuen Graphitrohres und der erneuten Kalibration sind nur rund 30 Proben messbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit des Rohres wurde der Argonstrom, der das Rohr zum Schutz umspült, über Petroleum geleitet. Hierbei wird angenommen, dass dies den Verschleiß teilweise kompensiert durch pyrolytische Neubeschichtung des Rohres mit Kohlenstoff während der Erhitzung. Dies hatte keinen feststellbaren verlängernden Effekt auf die Lebensdauer des Graphitrohres.

Von diesem Umstand abgesehen eignet sich die Methode sehr gut zur Analyse von Pflanzenproben. Der Arbeitsaufwand für die Analyse von 30 Proben an einem Tag beträgt inklusive des Austauschs eines Graphitrohres rund zwei Stunden. Die Analyse derselben Anzahl Proben nach Verflüssigung mittels eines mikrowellenbeschleunigten Säureaufschlusses dauert zwei Tage mit rund sechs Stunden Arbeitsaufwand. Die Standardabweichungen in **Abbildung 5.8** sind im Rahmen üblicher Werte. Die in dieser Abbildung hellgrau dargestellten Werte gehen auf je drei Messwerte an zwei verschiedenen Tagen zurück, wobei unterschiedliche Graphitrohre und Kalibrationen verwendet wurden. Mit Ausnahme von Schwefel führt dies zu keiner Erhöhung der Standardabweichung im Vergleich zu den anderen Messwerten, was für die Robustheit der Methode spricht. Die erhöhte Standardabweichung im Fall von Schwefel erklärt sich dadurch, dass aufgrund unterschiedlicher Probeneinwaagen unterschiedliche $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$ erhalten wurden: An einem Tag lagen die Messwerte am oberen Ende des kalibrierten Bereichs, wohingegen am zweiten Tag die Messwerte rund 1,4-fach höher als der höchste Kalibrationswert waren. Wie in **Abschnitt 5.3.1** erwähnt, werden in diesem Bereich noch Elementkonzentrationen bei Verwendung der Hyperbelfunktion berechnet. Hierdurch ist nach wie vor ein Vergleich mit anderen

⁸http://www.arabidopsis.org/abrc/catalog/natural_accession_1.html

⁹<http://arabidopsis.info/MultiResult?ecotype=ecotype;range=10>

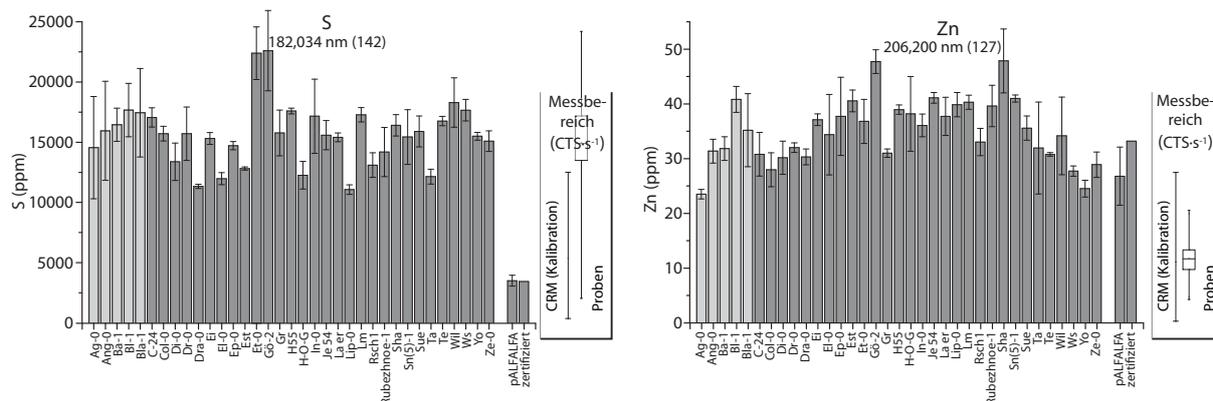


Abb. 5.8: Elementgehalte in *Arabidopsis*-Ökotypen – Fortsetzung. Für jeden Ökotyp wurden jeweils rund 1 mg Samen mit der vorgestellten Methode analysiert. Die dargestellten Proben wurden an vier verschiedenen Tagen quantifiziert, wobei jedesmal ein neues Graphitheizrohr und eine neue Kalibration mit dem CRM P-ALFALFA (Lucerne) verwendet wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von drei replikativen Messungen. Die hellgrau dargestellten Werte gehen auf je drei Messungen an zwei verschiedenen Tagen zurück. Für den Kalibrationsstandard P-ALFALFA wurde der Mittelwert und die Standardabweichung auf Grundlage je einer Messung pro Tag berechnet. Die Diagramme wurden durch das vorgestellte Programm generiert. Zur Einschätzung der Verlässlichkeit der berechneten Werte (ppm), wird hierbei in jedem Diagramm der kalibrierte Bereich dargestellt (in $\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$, nicht ppm!) und der Bereich in dem die Proben gemessen wurden ($\text{CTS} \cdot \text{s}^{-1}$). Für die Proben ist der Bereich als Boxplot dargestellt: Die Box reicht vom 25 % bis zum 75 %-Quantil der Daten. Zudem wird der minimale und der maximale gemessene Wert dargestellt. Idealerweise sollte diese Box mittig im (linearen) Kalibrationsbereich liegen.

Proben möglich, aber es gelten die oben erwähnten Limitierungen. Die in den Diagrammen angegebene Wiederfindung des Kalibrationsmaterials P-ALFALFA liegt zwischen 90 und 110 %. Der Vergleich mit den Daten, die nach Säureaufschluss und Analyse der flüssigen Proben erhalten wurden, zeigte, dass mit Ausnahme von P mit den beiden Methoden vergleichbare Werte erhalten wurden (vergl. **Abbildung 5.8** und **4.25**). Die vergleichende Analyse derselben Probe mit beiden Methoden bestätigte dies (**Tabelle 5.2**).

Element	Elementkonzentration (ppm)	
	ETV	Säureaufschluss
Ca	33042,4 \pm 3394,9	36385,0 \pm 1520,3
Cd	0,02 \pm 0,00	0,09 \pm 0,10
Cu	13,4 \pm 1,2	14,2 \pm 0,2
Fe	33,3 \pm 1,1	33,9 \pm 5,4
Mg	5225,6 \pm 299,6	5925,0 \pm 75,0
P	8432,6 \pm 592,8	6574,5 \pm 546,6
S	14620,0 \pm 678,8	15599,5 \pm 512,4
Zn	51,9 \pm 2,0	63,2 \pm 19,5

Tab. 5.2: Vergleich der Probenanalyse durch ETV-ICP OES mit der ICP OES Analyse nach Säureaufschluss. Für nicht dargestellte Elemente konnte aufgrund zu hoher oder zu niedriger Messwerte entweder kein Wert berechnet werden, oder die Elemente wurden nicht mit beiden Methoden quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von drei replikativen Messungen.

6 Diskussion

6.1 Interaktionsscreen

6.1.1 Prinzipieller Test des *Split Ubiquitin System*

Vor der Durchführung von Interaktionsscreens sollte die Funktion des *Split Ubiquitin Systems* (SUS) prinzipiell getestet werden. Mit dem hier verwendeten SUS wurde weder für die positiven, noch für die negativen Kontrollen ein positives Interaktionssignal erhalten (**Abschnitt 3.1**). Für *AtAKT1* wurde Selbstinteraktion bereits mit dem SUS gezeigt (Obrdlik *et al.*, 2004), weshalb es als positive Kontrolle eingesetzt wurde. Zu dem hier verwendeten SUS weist das von Obrdlik *et al.* verwendete System einige Unterschiede auf. Zum ersten ist es generell weniger stringent, wodurch auch schwache Interaktionen angezeigt werden (s. S. 45 für Erläuterungen): Alle C_{Ub} -Fusionsproteine ergeben in Kombination mit dem Wildtyp- N_{Ub} (N_{Ubi}) in Obrdlik *et al.* ein positives Interaktionssignal, was beim hier eingesetzten SUS nicht der Fall war. Zudem sind die Peptid-*Linker* zwischen N_{Ub} /*AtAKT1* und zwischen C_{Ub} /*AtAKT1* in Obrdlik *et al.* sechs bzw. sieben Aminosäuren länger als bei den hier eingesetzten Konstrukten (*AtAKT1*/pNubAGW-L und *AtAKT1*/pM-Cub).¹ Die Länge und Sequenz der *Linker* hat entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis von Interaktionstest mit Y2H-Systemen, wie im folgenden **Abschnitt 6.1.2** näher behandelt wird. Um die generell geringere Stringenz des von Obrdlik *et al.* verwendeten Systems zu kompensieren, wurde hier anstatt der bei Obrdlik *et al.* verwendeten stringentesten N_{Ub} -Variante (N_{UbG}) die weniger stringente N_{UbA} -Variante des N_{Ub} -Vektors eingesetzt, um die *AtAKT1*-Selbstinteraktion zu bestätigen.² Dass trotzdem keine Selbstinteraktion von *AtAKT1* beobachtet wurde, ist möglicherweise den kürzeren *Linkern* der Vektoren pM-Cub und pNubAGW-L zuzuschreiben. Allerdings erhalten auch Obrdlik *et al.* für die Interaktion von *AtAKT1* mit sich selbst nur unter solchen Bedingungen (0 mM Met) ein positives Signal, unter denen auch für andere Proteinpaaare (z. B. *AtKAT1*- C_{Ub} und N_{Ub} -*AtSUT2*) *unspezifische* Signale erhalten werden. Da Kandidaten von zu diesem Zeitpunkt bereits durchgeführten ersten Screens erfolgreich bestätigt werden konnten

¹*Linker* der N_{Ub} -Vektoren von Obrdlik *et al.*: N_{Ub} -PGGSTSLYKKAGSPTT-*AtAKT1* (die einfach unterstrichene Sequenz ist homolog zum Linker von pNubI(A,G)GW und pNubAGW-L, vergl. **Anhang A.2**); C_{Ub} -Vektor von Obrdlik *et al.* (pMetYCgate): *AtAKT1*-YPAFLYKVVGGGGSGGGGS- C_{Ub} ; C_{Ub} -Vektor hier (pM-Cub): *AtAKT1*-NPAFLY-KVVDSY- C_{Ub}

²Zur Modifikation der Stringenz innerhalb einer Variante des SUS vergl. **Abbildung 1.2**

(Abbildung 3.5), kann trotz der negativen Resultate mit *At*AKT1 auf die prinzipielle Funktionsfähigkeit des SUS geschlossen werden.

6.1.2 Identifikation von Interaktoren für *At*MTP1, -2 und -3

Durch das *Screening* von zwei *Arabidopsis* cDNA-Bibliotheken mithilfe des SUS wurden insg. 122 Interaktionskandidaten für vier Mitglieder der *Cation Diffusion Facilitator*-Familie identifiziert (Tabelle 3.1). Unter Verwendung der identifizierten *Prey*-Vektoren der Bibliotheken wurden hiervon 18 Kandidaten in diesem System nach Re-Transformation frischer Hefenzellen bestätigt (Abbildung 3.8). Die Sequenzierung der Kandidaten ergab, dass sie 13 verschiedene Proteine kodierten. In der Liste der Kandidaten in Tabelle 3.2 sind drei weitere Proteine enthalten, die bisher noch nicht im SUS überprüft wurden, aber als einzige Kandidaten für *Ab*MTP1 und *At*MTP2 weitergeführt wurden. Die in den Bibliotheken im Screen identifizierten *Prey*-cDNAs waren entweder stark verkürzt oder umfassten untranslatierte Sequenzen am 5'-Terminus. Für weitergehende Experimente wurde der vollständige ORF der meisten Kandidaten aus mehreren Gründen neu kloniert: Zum einen könnte die Interaktion des verkürzten Proteins mit dem jeweiligen *Bait*-MTP ein Artefakt sein, weshalb die Interaktion mit dem vollständigen Protein überprüft werden sollte. Untranslatierte 5'-Sequenzen könnten bei weitergehenden Experimenten unerwünschte modifizierende Auswirkungen auf die Expressionsstärke haben. Weiterhin kann nicht davon ausgegangen werden, dass verkürzte Proteine biologische Aktivität haben, obwohl im Fall von autoinhibitorischen Domänen auch das Gegenteil zutreffen kann (z.B. C-terminale autoinhibitorische Domäne der V-ATPasen AHA1 und AHA2, s. Axelsen *et al.*, 1999; Baunsgaard *et al.*, 1996).

6.1.3 Die Stärke der Interaktion konnte nicht bestimmt werden

Einfluss auf die Stärke einer Interaktion zwischen zwei Proteinen hat z. B. die Affinität der interagierenden Proteine zueinander, die Häufigkeit des Zustandekommens der Interaktion und die Interaktionsdauer. Es vorstellbar, dass bei einem wenig stringenten Screen auch Protein-Protein-Interaktionen angezeigt werden, die nicht auf eine nennenswerte Affinität der Proteine zueinander zurückgehen, sondern auf die Häufigkeit des Zusammentreffens dieser Proteine. Tatsächlich zeigten Wittke *et al.* (1999) für Membranproteine, dass durch ein Ura3-Reporter-basiertes SUS auch unspezifische Interaktionen zwischen Proteinen benachbarter Membranen (z. B. Golgi-/ER-/vakuoläre Membran) in Abhängigkeit von der lokalen Konzentration dieser Proteine zu einem positiven Interaktionssignal führen können. Innerhalb der existierenden Varianten des SUS, die sich durch verschiedene Kombinationen aus Reportern und Selektionsmöglichkeiten kennzeichnen, ist die Stringenz des SUS durch die Verwendung verschiedener N_{ub} -Mutanten des N_{ub} -Vektors justierbar (Abbildung 1.2). Für die Durchführung eines solchen Tests wurde der vollständige ORF der Kandidaten mit dem Gateway®-System in verschie-

dene N_{Ub} -Vektoren kloniert. Wie in **Abschnitt 3.3.1** gezeigt wurde, fiel hier der stringentere Interaktionstest unter Verwendung der N_{UbA}/N_{UbG} Varianten für alle zehn getesteten Kandidaten negativ aus. Zum einen könnte dies auf eine unspezifische Interaktion sowohl im primären Screen und als auch bei der Bestätigung zurückgehen. Ein weitere mögliche Erklärung könnten die Unterschiede im Aufbau der Vektoren pNubGGW und pNubAGW zu den *Prey*-Vektoren sein, die bei der Konstruktion der LD- und FS-Bibliothek eingesetzt wurden (pCUP-CGK bzw. pGOi; s. **Abschnitt 2.2**). Aufgrund des bei allen Vektoren identischen *pCUP1*-Promotors zur Expression der cDNAs hat wahrscheinlich die unterschiedliche *Linker*-Sequenz zwischen N_{Ub} und den klonierten cDNAs den größeren Einfluss auf das Verhalten der Vektoren im SUS (**Anhang A.2**). Die Sequenz und die Länge der *Linker* bestimmt die räumliche Orientierung von N_{Ub} zum *Prey*-Protein. Änderungen der *Linker* können somit die Anzeige einer zuvor beobachtet Interaktion zwischen *Bait* und *Prey* verhindern, wenn hierdurch die zwei notwendigen Interaktionen zwischen den vier Komponenten der beiden Hybridproteine sterisch nicht möglich sind (s. Schema in **Abbildung 1.2**). Derselbe Einfluss, den *Linker*-Sequenzen auf die räumliche Orientierung von N_{Ub} zum fusionierten *Prey*-Protein haben, ergibt sich auch aus der Neuklonierung der Kandidaten: Hierdurch wurden – im Vergleich zu den identifizierten *Prey*-cDNAs – Sequenzen entfernt oder hinzugefügt. Die Interaktion der Kandidaten unter Verwendung der N_{Ubl} -Variante wurde zuvor nur mit den identifizierten *Prey*-Vektoren der Bibliotheken (pCUP-CGK bzw. pGOi) überprüft (**Abbildung 3.8**). Um den Einfluss der veränderten Sequenz zwischen N_{Ub} und den identifizierten Kandidat-Fragmenten auf das Ergebnis der Interaktionstests abzuschätzen, wurden zwei Kandidaten in den Vektor pNubIGW kloniert. Beim anschließend durchgeführten Tropfentest (**Abbildung 3.9**) konnte für diese Kandidaten das in **Abbildung 3.8** gezeigte Ergebnis des Interaktionstest *nicht* bestätigt werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Länge der *Linker* zwischen N_{Ubl} und der cDNA in pNubIGW und dem Bibliotheksvektor pCUP-CGK nahezu identisch ist (16 bzw. 17 Aminosäuren, s. **Anhang A.2**). Allerdings liegen bei den beiden getesteten Kandidaten im Vektor pNubIGW 517 bzw. 489 (At4g27500 bzw. At5g37310) zusätzliche Aminosäuren des N-Terminus im Vergleich zum Vektor pCUP-CGK der cDNA-Bibliothek vor. In letzterem wurden jeweils nur kurze C-terminalen Fragmente identifiziert (95 bzw. 105 Aminosäuren), deren Interaktion mit den MTPs durch Neutransformation frischer Hefen bestätigt wurde. Das unterschiedliche Ergebnis des Interaktionstests bei Verwendung des N_{Ubl} -Vektors der Bibliothek im Vergleich zur Verwendung von pNubIGW könnte daher auch darauf zurückgehen, dass im vollständigen Protein die Domänen nicht zugänglich sind, die beim verkürzten Protein die Interaktion mit dem *Bait*-MTP vermitteln. Um zu überprüfen, ob die zusätzlichen Aminosäuren oder die unterschiedliche *Linker*-Sequenz die Anzeige der Interaktion verhindern, sollten in einem zukünftigen Experiment auch die im Screen identifizierten cDNA-Fragmente in pNubIGW kloniert werden. In jedem Falle wurde durch dieses Experiment für die beiden in pNubAGW, pNubAGW und pNubIGW klonierten Kandidaten gezeigt, dass das negative Ergebnis der stringenteren Interaktionstest nicht oder nicht nur auf die erhöhte Stringenz der N_{Ub} -Varianten zu-

rückgeht: Die für die Stringenztests eingesetzten stringenteren Vektoren pNubAGW und pNubGGW sind – bis auf die Aminosäure 13 von N_{ub} – identisch zu dem am wenigsten stringenten pNubIGW. Wahrscheinlich verursachten die Veränderungen durch die Neuklonierung auch bei den anderen Kandidaten das negative Ergebnis der Stringenztests – und nicht die erhöhte Stringenz der N_{ub}-Varianten. Obwohl somit bisher die Stärke der Interaktion der Kandidaten mit den entsprechenden MTPs nicht getestet werden konnte, ist aufgrund der sehr gut reproduzierbaren Interaktionstest bei Verwendung der Bibliotheksvektoren weiterhin davon auszugehen, dass unter den Kandidaten in **Tabelle 3.2** *tatsächliche* CDF-Interaktoren sind – zumindest im heterologen Hefesystem.

6.1.4 Einfluss der CDF-Interaktionskandidaten auf die Zn-Homöostase in Hefe

Der Test der Stärke der Interaktion ist zwar ein Mittel um falsch-positive Kandidaten herauszufiltern, da es sich aber um ein heterologes System handelt, können hierbei auch *tatsächliche* Interaktoren verloren gehen. Dies trifft auch auf das Experiment zu, das zum Test des Einflusses der Kandidaten auf die Metallhomöostase der Hefe durchgeführt wurde (**Abschnitt 3.3.2**). Hierbei wurden die Kandidaten alleine und zusammen mit den entsprechenden CDFs in der Zn-hypersensitiven Mutante *zrc1 cot1* exprimiert. Einerseits bietet dieses Experiment die Chance, den qualitativen Einfluss des Interaktionskandidaten auf die Fähigkeit des CDF-Proteins abzuschätzen, die Zn-Sensitivität der Mutante zu komplementieren. Hiermit wäre ein erster Hinweis auf die Funktion der Interaktion des Kandidaten mit dem CDF-Protein in der Pflanze gegeben. Andererseits können bei einem negativen Ergebnis aufgrund des heterologen Systems keine Rückschlüsse bezüglich der Interaktion mit dem CDF und deren Funktion *in planta* gezogen werden. Wie in **Abschnitt 3.3.2** gezeigt, wurde für die meisten Kandidaten nur ein sehr subtiler Einfluss auf die Zn-Sensitivität von *zrc1 cot1* festgestellt. Lediglich At5g37310 (putatives Endomembran Protein 70) bewirkte eine *deutlich* erhöhte Zn-Sensitivität von *zrc1 cot1* – unabhängig von der Co-Expression mit *AtMTP3*. Wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird, handelt es sich bei diesem Protein wahrscheinlich um einen Kanal oder Transporter der Plasmamembran, der entweder spezifisch oder unspezifisch Zn-transportiert und mutmaßlich zu erhöhten Zn-Konzentrationen in der Zelle führt. Erhöhte Zn-Toleranz wurde nur im Fall der Co-Expression von At4g27500 (*AtPPI1*) mit *AtMTP3* beobachtet. Diesem ebenfalls im folgenden Abschnitt im Detail behandelte Kandidaten wurde eine Erhöhung der Aktivität der Plasmamembran H⁺-ATPase *AtAHA1* zugeschrieben (Morandini *et al.*, 2002; Viotti *et al.*, 2005). Für alle verbleibenden *AtMTP3*-Interaktionskandidaten wurde in den beiden Experimenten kein eindeutiger Einfluss beobachtet und für die Interaktionskandidaten von *AtMTP1*, -2 und *AbMTP1* wurden diese Experimente bisher nicht durchgeführt.

6.1.5 Verknüpfung der Ergebnisse des Screens mit Literaturdaten und *in silico* Analyse

Neben den durchgeführten Tests auf die Stärke der Interaktion lassen sich Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit einer echten, biologisch relevanten Interaktion zwischen Kandidat und MTP auch durch den Vergleich von Daten wie der Lokalisation und dem Zeitpunkt der Expression auf zellulärer Ebene und in der Pflanze ziehen. Diese Strategie wurde durch Miller *et al.* (2005) angewandt, um die von einer anderen Variante des SUS detektierten 1985 Interaktionen zwischen 536 Proteinen auf 131 Interaktionen der höchsten Sicherheit zu reduzieren. Die hierbei verwendete Methode ist sehr elegant, aber arbeitsintensiv: Mithilfe von Robotern wurden alle 705 getesteten Proteine sowohl in einen N_{Ub}-Vektor als auch in einen C_{Ub}-Vektor kloniert und Doppeltransformanten erzeugt, die ebenfalls maschinell auf *Arrays* getropft wurden. Durch die Interaktion wird eine Auxotrophie des verwendeten Hefestamms komplementiert, weshalb die am schnellsten wachsenden Tropfen auf eine Interaktion hindeuten. Nach zweifacher Wiederholung des Test wurden die Ergebnisse des Test mit Literaturdaten in einer *Support Vector Machine* (SVM) vereint. Die SVM wurde mit positiven Interaktionen trainiert und lieferte als Ergebnis vier Kategorien der Glaubwürdigkeit der ursprünglich vom SUS detektierten Interaktionen. Obwohl der Umfang dieser Experimente außerhalb der Möglichkeiten dieser Arbeit liegt, lässt sich der Ansatz übertragen.

In **Tabelle 3.3** sind die experimentell unterstützten subzellulären Lokalisierungen aufgelistet, die durch Abfrage der SUBA Datenbank (Heazlewood *et al.*, 2005) erhalten wurden. Zudem wurden die durch ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003) und LOCTREE (Nair und Rost, 2005) vorhergesagten Lokalisierungen angegeben. Beide Vorhersageprogramme liefern momentan die besten Ergebnisse: ARAMEMNON vereint die Ergebnisse von zehn bereits existierenden Programmen (s. Erklärung in **Tabelle 3.3**) und LOCTREE simuliert durch die Aneinanderkettung mehrerer SVMs die zellulären Mechanismen des Protein-*Targeting*. Für die *Baits AtMTP1* und -3 ist die Lokalisation in der vakuolären Membran in Hefe und in der Pflanze bekannt (Arrivault *et al.*, 2006; Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005; Kobae *et al.*, 2004), und für *AtMTP2* kommt nur die Membran der Vakuole oder des ER in Frage (**Abschnitt 4.2.4**). Interaktionskandidaten, die mit großer Sicherheit Transmembranhelices aufweisen, sollten in der pflanzlichen Zelle Teil der benannten Membranen sein, um als wahre Interaktoren für diese CDFs in Frage zu kommen. Wie schon in **Tabelle 3.3** angemerkt, kann vakuoläre Lokalisation weder von ARAMEMNON noch von LOCTREE genau vorhergesagt werden und ist hier Teil des *Secretory pathway*. Dies Vorhersage wird tatsächlich mit 90 % Sicherheit für alle drei CDF von LOCTREE getroffen. Rund die Hälfte der von ARAMEMNON abgefragten Vorhersageprogramme sagt für *AtMTP3* mit ≈60 % Sicherheit chloroplastidäre Lokalisierung voraus und die andere Hälfte mit der selben Sicherheit mitochondriale Lokalisierung. Dies entspricht beides nicht der experimentell gefundenen vakuolären Lokalisierung des EGFP/*AtMTP3* Fusionsproteins. Unter Beachtung dieses Um-

standes kann es somit nur als positiver Hinweis gewertet werden, wenn für *AtMTP1* und *AtMTP3*-Interaktionskandidaten der *Secretory pathway* vorhergesagt wird – wobei auch diese Vorhersage falsch sein kann. Auch zytosolische Interaktoren sind für alle *Baits* vorstellbar, wobei diese auch membranverankert sein können (z. B. über Glycosylphosphatidylinositol, s. Borner *et al.*, 2003).

Anhand von **Tabelle 3.3** ist ersichtlich, dass eine Aussage bezüglich der wahrscheinlichen Lokalisierung der Kandidaten häufig nicht eindeutig vorzunehmen ist. Sowohl die *in silico* Analyse als auch die experimentellen Daten liefern in sich widersprüchliche Ergebnisse. Die auffälligsten sind:

- *At5g53560/Cytochrom b5 Isoform 1/AtB5-A* (*AtMTP1*-Interaktionskandidat): Von LOCTREE mit 100 % Sicherheit im ER vorhergesagt (Wert geht auf SWISSPROT-Annotation zurück), durch massenspektrometrische Identifikation als Teil des Thylakoidmembran-Proteoms identifiziert (Peltier *et al.*, 2004), Marmagne *et al.* (2004) lokalisierten *AtB5-A* als DsRed2-Fusionsprotein in der Plasmamembran.
- *At1g04410/Malat Dehydrogenase*, zytosolisch, putativ (*AtMTP2*-Interaktionskandidat): Von LOCTREE als zytoplasmatisches oder mitochondriales Protein vorhergesagt, durch massenspektrometrische Identifikation einmal als Teil des Nukleus-Proteoms (Bae *et al.*, 2003) und einmal als Teil des Plasmamembran-Proteoms gefunden (Alexandersson *et al.*, 2004).

Für die neun Kandidaten, für die neben der computergestützten Vorhersage auch experimentelle Daten der subzellulären Lokalisierung verfügbar sind, kann daher nur für fünf eine relativ sichere Aussage getroffen werden:

- *At3g17930/expressed protein* (*AtMTP1*-Interaktionskandidat): Chloroplastidäres Protein mit zwei Transmembranhelices (ARAMEMNON, LOCTREE), wahrscheinlich Teil des Thylakoidmembran-Proteoms (Peltier *et al.*, 2004).
- *At1g50020/tubulin α -6 chain-related* (*AtMTP1*-Interaktionskandidat): Chloroplastidäres Protein mit einer Transmembranhelix (ARAMEMNON), wahrscheinlich Teil des Thylakoidmembran-Proteoms (Peltier *et al.*, 2004); Vorhersage der zytoplasmatischen Lokalisierung durch LOCTREE hat niedrige Wahrscheinlichkeit.
- *At3g45600/senescence-associated family protein* (*AtMTP3*-Interaktionskandidat): Zweimal als Teil des Plasmamembran-Proteoms identifiziert (Alexandersson *et al.*, 2004; Marmagne *et al.*, 2004), *Secretory Pathway* in ARAMEMNON und LOCTREE.
- *At1g24520/Anther Specific Protein AtAGP1* (*AtMTP3*-Interaktionskandidat): Wird als »exportiert« vorhergesagt (LOCTREE, ARAMEMNON; beide 100 % Sicherheit). Die extrazytologische Verankerung mit der Plasmamembran über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) wurde von Borner *et al.* (2002) vorhergesagt und bestätigt (Borner *et al.*, 2003; massenspektrometrische Analyse des Plasmamembran-Proteoms).
- *At5g37310/Endomembran Protein 70*, putativ (*AtMTP3*-Interaktionskandidat): Als Bestand-

teil des Zellwand-Proteoms identifiziert (Bayer *et al.*, 2006), *Secretory Pathway* in ARAMEMNON, mit fast niedrigster Wahrscheinlichkeit von LOCTREE als Protein des Nukleus vorhergesagt (nicht DNA bindend).

Neben der subzellulären Lokalisierung sind auch Daten über die Verteilung der Expression in den verschiedenen Geweben der Pflanze sowie der Zeitpunkt der Expression hilfreich, um eine Einschätzung bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer biologisch relevanten Interaktion zu vorzunehmen. Hierzu wurden durch ATGENEXPRESS und mehrere kleinere Projekte generierte Affymetrix Genechip®-Daten mit Werkzeugen wie GENEVESTIGATOR³ (Zimmermann *et al.*, 2004), BAR EFP BROWSER Schmid *et al.*, 2005 und CSB.DB⁴ (Steinhauser *et al.*, 2004) abgefragt. Als Alternative zu den Hybridisierungsdaten wurde die MPSS-Datenbank⁵ (Brenner *et al.*, 2000) von Transkript-Signatursequenzen abgefragt.

6.1.5.1 Putative *AtMTP1* Interaktoren

Basierend auf den oben aufgelisteten Vorhersagen erscheint eine Interaktion zwischen *AtMTP1* und At3g17930 bzw. *AtMTP1* und At1g50020 in der Pflanzenzelle extrem unwahrscheinlich, da diese Kandidaten bei einer Lokalisierung in der Thylakoidmembran unzugänglich für *AtMTP1* – einem Protein der vakuolären Membran – wären. Ein weiterer Hinweis, dass At3g17930 und At1g50020 Funktionen im selben *Pathway* haben, ist die durch CSB.DB aufgezeigte deutlich positive Co-Regulation der beiden Gene zueinander (Spearman = 0,78; $P = 2,4 \cdot 10^{-11}$). Gemäß der ATGENEXPRESS-Daten sind die beiden Gene in allen grünen Pflanzenteilen vergleichbar exprimiert. Im Gegensatz hierzu ist die Expression von *AtMTP1* im Vergleich zu beiden Genen in allen Geweben stark unterschiedlich. Dass At3g17930 dreimal identifiziert wurde (in zwei unabhängigen Screens), reflektiert wahrscheinlich lediglich die Häufigkeit von chloroplastidären Transkripten in der Zelle. Da keine der beiden verwendeten cDNA-Bibliotheken normalisiert wurde, ist diese Häufigkeit auch in den Bibliotheken gegeben. Zudem sind in Hefe chloroplastidäre Proteine grundsätzlich falsch lokalisiert, was zur unspezifischen Interaktion mit vakuolären Proteinen wie *AtMTP1* führen kann.

Einer der zwei verbleibenden *AtMTP1*-Interaktionskandidaten ist At5g53560, die Isoform 1 von Cytochrom b5 (*AtB5-A*). Alle Vorhersagen der subzellulären Lokalisierung widersprechen sich für dieses Protein (s. oben). Die Cyt b5 Isoformen von Säugetieren sind gut charakterisiert (Borgese *et al.*, 1993). Hier, ebenso wie in Pflanzen (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 1999), wurde es als Bestandteil der Kette der Elektronenübertragung von NADH auf Fettsäuren bei deren Desaturierung beschrieben. In Säugetieren gilt die ER-Lokalisierung als gesichert (Borgese *et al.*, 1993). Bei der Analyse der Sequenz von *AtB5-A* fällt auf, dass wie bei vielen ER-residenten Membranproteinen (Teasdale und Jackson, 1996)

³<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

⁴<http://csbdb/index.html>

⁵<http://mpss.udel.edu/at/>

ein KKKXX-Motiv im C-Terminus gefunden wird. Die 100%ige Sicherheit bei der Vorhersage durch LOCTREE, dass es sich um ein Protein des ER handelt, geht auf die Annotation durch SWISSPROT zurück, die von LOCTREE allerdings nur als Bestätigung bei großer Sicherheit der Vorhersage durch die Kette der SVMs (s. oben) abgefragt wird. Obwohl (sich widersprechende) experimentelle Daten für die subzelluläre Lokalisierung verfügbar sind, erscheint somit die vorhergesagte ER-Lokalisierung am wahrscheinlichsten. Gemäß der Daten von MPSS sowie ATGENEXPRESS liegen sowohl von *AtB5-A* als auch von *AtMTP1* in der Wurzel erhöhte Transkriptmengen vor. Trotz dieser ähnlichen Gewebespezifität der Expression spricht eine ER-Lokalisierung gegen die Möglichkeit, dass es sich bei *AtB5-A* um einen biologisch relevanten Interaktor des vakuolären Zn-Transporters *AtMTP1* handelt.

Der letzte verbleibende *AtMTP1*-Interaktionskandidat ist das *SQUAMOSA promotor binding like protein-1* (*AtSPL1*, At2g47070). *SQUAMOSA*-Promotor bindende Proteine (SBPs) sind putativ pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren, die ursprünglich in *Antirrhinum majus* identifiziert wurden. Die 95%ige Sicherheit der LOCTREE-Vorhersage, dass *AtSPL1* im Zellkern lokalisiert ist, deckt sich mit der Klassifizierung als Transkriptionsfaktor. *AmSBP1* und -2 binden an die Promotor-DNA des »Blütenmeristem Identität-Gens« *SQUAMOSA* und kontrollieren die Entwicklung der Blüte. In *Arabidopsis* wurden 16 SBPs identifiziert (*SPL1* bis -16, Cardon *et al.*, 1999), wovon nur wenige charakterisiert sind. *AtSPL3* wird als *AmSBP1/2*-Ortholog betrachtet. Pflanzen, die *AtSPL3* konstitutiv überexprimierten, blühten verfrüht (Cardon *et al.*, 1997). *AtSPL8* wird benötigt für die Entwicklung des Pollensacks (Unte *et al.*, 2003) und *AtSPL14* spielt eine Rolle bei der Blattmorphologie und bei der Sensitivität gegenüber Pilztoxinen (Stone *et al.*, 2005). Die SBP-Proteine kennzeichnen sich durch eine hochkonservierte DNA-bindende Domäne (SBP-Box) mit insgesamt acht Cys/His-Resten (CX₄CX₁₃HX₅HX₁₅CQQCX₃HX₁₁C), deren Lösungsstruktur mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) inzwischen für *AtSPL4*, -7 und -12 aufgeklärt wurde (Übersicht in Yamasaki *et al.*, 2006). Demnach werden hiervon zwei aufeinander folgende Zn-bindende Bereiche gebildet. Dem näher am N-Terminus gelegenen Bereich wird die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur des Proteins zugeschrieben. Von dem zweiten gebundenen Zn²⁺ glaubt man, dass es die DNA-Bindung vermittelt, indem es eine basische C-terminale Schleife des Proteins korrekt in die *major groove* der DNA geleitet. Mit dem *Copper Response Regulator-1* (*Crr1*) wurde in *Chlamydomonas* ein SBP-Protein charakterisiert, das eine wichtige Rolle bei der Cu-Homöostase spielt (Kropat *et al.*, 2005). Die *Arabidopsis*-Verwandten mit der größten Ähnlichkeit sind *AtSPL1*, -7 und -12. Die Funktion der Regulierung der Cu-Homöostase wird vermittelt durch transkriptionale Aktivierung von Zielgenen durch die Bindung von *Crr1* an sog. *Copper Response Elements* (CuREs). Es wurden zwei Modelle vorgeschlagen, in denen *Crr1* drei biochemische Aktivitäten zugeschrieben werden: Die Erkennung von CuREs in Zielgenen, die Funktion als Cu-Sensor und die transkriptionelle Aktivierung. Das Schlüsselement der Regulation ist in beiden Modellen die Bindung von Cu: Entweder wird bei Cu-Überschuss das in der SBP-Domäne gebundene Zn durch Cu ersetzt, was nach struktureller Reorganisation die Dissoziation von *Crr1*

von der DNA bewirkt. Von Kropat *et al.* wurde vorgeschlagen, dass zwei His-Reste der SBP-Domäne, die nicht an der Zn-Bindung beteiligt sind, die Cu-Konzentration »messen« (Cu-Sensing). Cu-Bindung an diese His-Reste führt evtl. zur Reorganisation aller zehn His-Liganden der SBP-Domäne und resultiert im Austausch des gebundenen Zn durch Cu. Ersatz von Zn durch Cu wurde bereits für Metallothioneine von Säugetieren beschrieben (Zhang *et al.*, 2003). Alternativ wird vorgeschlagen, dass Cu an den Cys-reichen C-Terminus von Crr1 bindet, der Ähnlichkeit zu *Drosophila*-Metallothionein zeigt. Dies bewirkt wiederum durch intramolekulare Kommunikation die Dissoziation von Crr1 von der DNA. Der Beladungsstatus der SBP-Domäne mit Cu oder Zn ist somit die kritische Komponente der Regulation. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde in Hefe bzw. *E. coli* gezeigt, dass die freie Cu- und Zn-Konzentration in der Zelle praktisch Null ist (O'Halloran, 1993; Outten und O'Halloran, 2001). Dass in Hefe Cu aktiv zu Cu-benötigenden Proteinen wie der P-Typ ATPase Ccc2, der zytosolischen Cu,Zn-SOD und Cytochrom c Oxidase durch die Cu-Chaperone Atx1, Ccs und Cox17 geliefert wird (Lin *et al.*, 1997; Culotta *et al.*, 1997; Horng *et al.*, 2004), ist daher nicht unerwartet. Zu Atx1, Ccs und Cox17 orthologe Cu-Chaperone wurden in *Arabidopsis* identifiziert (Wintz und Vulpe, 2002). Enzyme, die Metalle im aktiven Zentrum tragen, verlieren dieses wahrscheinlich selten und es ist anzunehmen, dass sie nach ihrer Synthese nicht sehr häufig erneut damit beladen werden müssen. Wenn selbst solche Proteine aktiv beladen werden, erscheint es um so wahrscheinlicher, dass Proteine wie Crr1, deren Funktion kritisch vom wechselnden Metallbeladungszustand abhängt, aktiv beladen werden. Die phylogenetisch nahe Verwandtschaft zwischen Crr1 und AtSPL1 legt nahe, dass auch AtSPL1 eine Rolle bei der Metallhomöostase spielt – evtl. sogar bei der Cu-Homöostase. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass AtSPL1 in einem Screening-System identifiziert wurde, in dem 30 µM Cu eingesetzt werden. Rein spekulativ ist ein Szenario vorstellbar, in dem Cu durch ein Cu-Chaperon zum DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor Crr1(/SPL1?) geliefert wird, der daraufhin von der DNA dissoziiert und den Nukleus verlassen kann. Abhängig vom Cu(Chaperon)/Zn-Gleichgewicht könnte die Wiederbeladung mit Zn durch ein weiteres Chaperon oder durch direkte Zn-Übergabe von einem Zn-Transporter erfolgen. Obwohl AtSPL1 als Interaktor von AtMTP1 identifiziert wurde, ist ein direkter Zn-Transfer von AtMTP1 auf AtSPL1 unwahrscheinlich, da AtMTP1 Zn aus dem Zytoplasma in die Vakuole transportiert. Es ist allerdings möglich, dass AtMTP1 der Ort der Beladung durch eine dritte, unidentifizierte Komponente ist. Es ist auch vorstellbar, dass AtSPL1 die Aktivität von AtMTP1 durch Bindung an diesen moduliert: Eine Unterbindung des Zn-Transports in die Vakuole könnte die Wiederherstellung des Cu/Zn Gleichgewichts im Zytoplasma beschleunigen. All dies sind jedoch nur Mutmaßungen, aus denen sich Experimente ableiten lassen, um diese Theorien zu überprüfen. CSB.DB zeigt keine Co-Regulation der Gene an (Tabelle 3.2). Gemäß ATGENEXPRESS und MPSS sind in der Wurzel und in Blüten vergleichbare Transkriptmengen. Dies unterstützt die Möglichkeit einer funktionellen Kopplung – zumindest in diesen Geweben. Im Xylem der Rosette liegen dagegen gemäß der ATGENEXPRESS-Daten relativ hohe AtSPL1-Transkriptmengen vor, aber kein AtMTP3-Transkript.

Dem Ansatz der Kategorisierung von Miller *et al.* (2005) folgend, kann nur *AtSPL1* die höchste Sicherheit zugeschrieben werden, ein wahrer *AtMTP1*-Interaktor zu sein, und die weiteren drei Kandidaten fallen in die Kategorie der niedrigsten Sicherheit.

6.1.5.2 Putative *AbMTP1* Interaktoren

Die Motivation, *AbMTP1* im Screen von *A. thaliana*-Bibliotheken einzusetzen, lag in der Annahme, dass im Fall der Identifikation von ähnlichen oder gleichen Kandidaten wie für *AtMTP1* die Wahrscheinlichkeit hoch ist, *echte* MTP1-Interaktoren identifiziert zu haben. Es wurden allerdings keine *AbMTP1*-Interaktionskandidaten gefunden, die Ähnlichkeit zu den Kandidaten der anderen *Bait-MTPs* aufweisen. Für At2g31800 wurde durch Rudrabhatla *et al.* (2006) ein Kinasemotiv mit hoher Sicherheit vorhergesagt und laut LOCTREE ist es mit 90 % Sicherheit ein zytosolisches Protein. Analyse durch INTERPRO⁶ bestätigt das Vorhandensein eines Serin/Threonin Proteinkinase-Motivs (IPR008271) und darüber hinaus werden drei Ankyrin-Wiederholungen (IPR002110) im N-terminalen Bereich identifiziert. Ankyrin-Wiederholungen sind eine der am häufigsten auftretenden Protein-Protein-Interaktionsmotive der Natur (Mosavi *et al.*, 2002). At2g31800 weist über 71 % Identität zur Ankyrin Protein Kinase 1 (APK1) aus *Medicago truncatula* und 92/90 % Identität zu APKs aus *Brassica rapa/-napus*⁷ auf Aminosäureebene auf. In *Medicago* wurde für AKP1 gezeigt, dass vermehrt Transkript bei osmotischem Stress gebildet wird (Chinchilla *et al.*, 2003). Der Annotation der APKs von *Brassica* ist das bisher nicht publizierte Ergebnis zu entnehmen, dass auch diese APKs in der Antwort auf osmotischen Stress involviert sind, indem sie eine regulatorische Funktion auf die Expression von Osmotin haben. Der Promotor von Osmotin enthält ein GCC-Box-Motiv, an welches *Ethylene Response Element Binding Proteins* (EREBPs) binden. Von EREBPs wird angenommen, dass sie die Signalkette des Ethylen-*Pathways* mit anderen Signalen integrieren (Übersicht über den Ethylen-Signal-*Pathway* in Guo und Ecker, 2004). Die Verknüpfung des Ethylen-Signal-*Pathway* mit dem Metallhomöostasenetzwerk wird bereits durch die Tatsache nahegelegt, dass Cu für die Funktion der Ethylenrezeptoren ETR1/2, ERS1/2 und EIN4 benötigt wird. EIN2, ein weiteres Protein dieser Signalkette, ähnelt NRAMPs (Abschnitt 1.2.2), aber es konnte keine Transportaktivität festgestellt werden. Gemäß ATGENEXPRESS werden die höchsten Transkriptmengen in Pollen gefunden, was mit Daten für *AtMTP1* übereinstimmt. Allerdings wird im Gegensatz zu letzterem keine Transkript in Wurzeln angezeigt. Unter Berücksichtigung dieser Daten ist es durchaus vorstellbar, dass At2g31800 ein echter Interaktor von *Ab/AtMTP1* ist und eine Integration des Metallhomöostasenetzwerks bei der Antwort auf osmotischen Stress vermittelt.

Für At2g47010, den zweiten *AbMTP1*-Interaktionskandidat, sind keine Informationen verfügbar.

⁶<http://www.ebi.ac.uk/interpro/index.html>

⁷Accession Nr. der *Brassica* APKs: gi|51039796 (*B. rapa*), gi|51039798 (*B. napus*)

Der einzige Anhaltspunkt ist die Vorhersage der extrazellulären Lokalisierung durch LOCTREE. Insofern die LOCTREE SVM des *Secretory Pathway*, welche zwischen »exportiert« und »Organell« entscheidet, bei der getroffenen Vorhersage »exportiert« richtig liegt, würde dies At2g47010 als Interaktionskandidat für MTP1 ausschließen. Allerdings werden auch die vakuolären Proteine *AtMTP1* und -3 durch LOCTREE als »exportiert« vorhergesagt. Daher ist auch für At2g47010 vakuoläre Lokalisation durchaus möglich und somit auch eine Interaktion mit *AtMTP1*. Sterische Überlegungen sprechen allerdings gegen diese Möglichkeit: Für ein positives Interaktionssignal im SUS müsste das zytosolisch lokalisierte C_{ub} (fusionierte am C-Terminus von *AtMTP1*) mit einem im Lumen der Vakuole befindlichen N_{ub} interagieren. Dies erscheint unwahrscheinlich, auch wenn es Hinweise für das gelegentliche Auftreten membrandurchspannender C_{ub}/N_{ub}-Interaktionen im SUS gibt (Miller *et al.*, 2005). Analyse der ATGENEXPRESS-Daten zeigt, dass *AtMTP1* und At2g47010 in Wurzeln und Blüten vergleichbar exprimiert sind. Dies unterstützt die Möglichkeit einer funktionellen Kopplung dieser Proteine, auch wenn dies sehr spekulativ ist.

Zusammenfassend ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den beiden Kandidaten um echte MTP1 Interaktoren handelt, geringer als für *AtSPL1*, aber höher als für die anderen bisher behandelten Kandidaten.

6.1.5.3 Der putative *AtMTP2* Interaktor...

...At1g04410 kodiert putativ eine Malatdehydrogenase, wobei es sich hierbei trotz der Annotierung als zytosolische Isoform laut LOCTREE mit 71 % Sicherheit auch um die mitochondriale Isoform handeln kann. Wie bereits oben erwähnt, wurde es auch als Teil des Zellkernmembran- und Plasmamembran-Proteoms identifiziert. Bekannte Malatdehydrogenasen enthalten kein Zn (s. Beschreibung von IPR001252⁷) und es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass At1g04410 ein echter *AtMTP2* Interaktor ist.

6.1.5.4 Putative *AtMTP3* Interaktoren

Der erste *AtMTP3*-Interaktionskandidat in **Tabelle 3.2** ist At3g45600, der als *senescence-associated family protein* annotiert ist. Seneszenz von Blättern ist ein reguliertes Ereignis (Miller *et al.*, 1999), bei dem die Hochregulation der Expression von Cu-Chaperonen und Metallothioneinen beobachtet wurde (Abdel-Ghany *et al.*, 2005a; Guo *et al.*, 2003). Erst kürzlich wurde At3g45600 als Mitglied der Tetraspanin-Familie eingeordnet und als *AtTET3* bezeichnet (Cnops *et al.*, 2006). Für *AtTET1* (TORNADO2, TRN2) wurde eine Schlüsselfunktion beim *Patterning*⁸ während der frühen Blattentwicklung gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt ist anhand der verfügbaren Daten schwer einschätzbar, mit

⁸*Patterning* ist ein Prozess, der in multizellulären Organismen zur Bildung von Symmetrieachsen, Domänen bei der Organformation und letztendlich zur Differenzierung von Gewebe- und Zelltypen führt.

welcher Sicherheit es sich bei *AtTET3* um einen *AtMTP3* Interaktor handelt. Die überwiegende Expression in Blatt- und Sprossgeweben mit maximaler Expression im Rosetten-Xylem, Hypocotyl und Sprossknoten (laut ATGENEXPRESS-Daten) lässt jedoch eine funktionale Kopplung zu dem hauptsächlich in Wurzeln exprimierten *AtMTP3* eher unwahrscheinlich erscheinen.

Für den zweiten Kandidaten, At2g32580, ist noch weniger bekannt. Gemäß ATGENEXPRESS sind die Transkriptmengen in Wurzeln nicht höher als in allen anderen Geweben. Laut Vorhersage durch ARAMEMNON und LOCTREE handelt es sich um ein lösliches und sehr wahrscheinlich exportiertes Protein. Analyse durch INTERPRO ergab, dass in *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* 13 homologe Mitglieder unbekannter Funktion annotiert sind. Insofern die vorhergesagte extrazelluläre Lokalisierung korrekt ist, schließt dies At2g32580 als Interaktionskandidat für *AtMTP3* aus. Diesbezüglich gelten allerdings dieselben Überlegungen, die für At2g47010 (s. oben) diskutiert wurden.

At4g27500 wurde in einem Y2H-Screen als Interaktor der H⁺-ATPase AHA1 der Plasmamembran identifiziert und als *Proton Pump Interactor 1* (PPI1) bezeichnet (Morandini *et al.*, 2002). Die Lokalisation deckt sich mit der Identifikation als Bestandteil des Plasmamembran-Proteoms (Nühse *et al.*, 2003). Im C-Terminus wird durch ARAMEMNON und INTERPRO eine Transmembranhelix vorhergesagt, mit der *AtPPI1* in der Plasmamembran verankert sein könnte. Weitergehende Studien zeigten, dass *AtPPI1* mit dem C-Terminus von *AtAHA1* interagiert und die bereits aktivierte ATPase weiter stimuliert (Viotti *et al.*, 2005). Der C-Terminus von Plasmamembran-ATPasen wirkt als autoinhibitorische Domäne, deren autoinhibitorische Wirkung durch Senken des pH-Werts und durch die Bindung von 14-3-3 Proteinen aufgehoben wird (Palmgren, 2001). Erst die hierdurch ausgelöste Deplatzierung des *AtAHA1*-C-Terminus ermöglicht mutmaßlich die Bindung von *AtPPI1* an den C-Terminus. Plasmamembran-ATPasen erzeugen durch die Generierung eines Protonengradienten (Export von H⁺ aus dem Zytoplasma) die notwendige Triebkraft für eine Reihe von Transportprozessen. Die Bedingungen, unter denen *AtPPI1* die schon aktivierte H⁺-ATPase noch stärker aktiviert ($\approx 2\times$), sind bisher nicht bekannt. Die Co-Expression von *AtPPI1* und *AtMTP3* in *zrc1 cot1* führte zu einer leicht erhöhten Zn-Toleranz (Abbildung 3.10). Dies könnte auf die indirekte Erhöhung der Aktivität eines in Hefe bisher nicht identifizierte Zn²⁺/H⁺ Antiporters in der Plasmamembran zurückgehen. Auch in *Arabidopsis* wurde bisher kein in der Plasmamembran lokalisierter Zn²⁺/H⁺ Antiporters identifiziert. Im Menschen wurde mit *HsZnT1* ein Mitglied der CDF Familie identifiziert, das in der Plasmamembran lokalisiert ist und mutmaßlich Zn-Export aus der Zelle vermittelt (Palmiter und Huang, 2004). Eine Funktion von *AtPPI1* bei der Aufrechterhaltung der Zn-Homöostase durch indirekte Erhöhung der Zn-Exportkapazität der Zelle ist daher vorstellbar, aber die Rolle des vakuolär lokalisierten *AtMTP3* ist in diesem Zusammenhang nicht augenfällig: eine gleichzeitige Interaktion mit *AtMTP3* und *AtAHA1* – beim Modell einer hypothetischen *AtMTP3*-abhängigen Erhöhung der *AtAHA1*-Aktivität – erscheint unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz spricht die unabhängige Identifikation von *AtPPI1* in zwei verschiedenen Bibliotheken mit dem Bait *AtMTP3* (Tabelle 3.3) für eine biologisch

relevante Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen. Unterstützt wird die Möglichkeit einer funktionellen Interaktion durch MPSS- und ATGENEXPRESS-Daten, die für beide Proteine stark erhöhte Transkriptmengen in der Wurzel anzeigen. Möglich ist allerdings auch, dass die Interaktion von *AtPPI1* mit *AtMTP3* darauf zurückgeht, dass *AtPPI* in Hefe fälschlicherweise in der Vakuolenmembran lokalisiert ist: Bei Membranproteinen mit nur einer Transmembranhelix kann selbst bei nicht-heterologer Expression von Proteinen durch geringe Sequenzänderungen in der Transmembranhelix ein Protein statt zur Tonoplast- zur Plasmamembran geleitet werden und andersrum (Brandizzi *et al.*, 2002).

Der nächste Kandidat, *AtAGP1* (At1g24520), ist spezifisch im Tapetum von Staubbeutel sowie in Mikrosporen (Pollen) exprimiert und ist essenziell für die Entwicklung von fruchtbaren Pollen (Xu *et al.*, 1995). Wie schon oben aufgelistet, kann mit relativer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass *AtAGP1* über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran extrazytosolisch verankert ist. Von *AtMTP3* ist bekannt, dass es auch in Pollen und Blüten geringe Transkriptmengen vorliegen (Arrivault *et al.*, 2006). Während der Entwicklung von Mikrosporen bildet sich in der noch uninuklearen Zelle aus vielen kleinen Vakuolen eine einzige große Vakuole. Nach der Bildung der generativen Zelle innerhalb der vegetativen Zelle fragmentiert diese große Vakuole wieder, wobei die entstehenden Vesikel wahrscheinlich mit der Plasmamembran der vegetativen Zelle fusionieren (Yamamoto *et al.*, 2003). Insofern ist es durchaus vorstellbar, dass *AtMTP3* in Mikrosporen in der Plasmamembran lokalisiert und somit ein zugänglicher Interaktionspartner für *AtAGP1* ist. Xu *et al.* zeigten, dass *AtAGP1* in Pollen sehr stark exprimiert ist. Gemäß der Werte der Affymetrix-Hybridisierungssignale liegt im Pollen rund 1000× mehr *AtAGP1*-Transkript als *AtMTP3*-Transkript vor ($AtAGP1:AtMTP3 = 177\,000:112$)⁹. Somit ist *AtAGP1* in der nicht-normalisierten SUS-cDNA-Bibliothek (LD-Bib., aus Blüten, s. S. 27) stark überrepräsentiert, was die Wahrscheinlichkeit der Detektion von im SUS falsch-positiven Hefe-Doppeltransformaten erhöht. Selbst wenn eine biologisch relevante Interaktion auch dann nicht ausgeschlossen werden kann, wenn auch auf Proteinebene ein Verhältnis von 1000:1 gefunden wird, so erscheint eine solche Interaktion zumindest sehr unwahrscheinlich.

Novel Plant SNARE 13 (*AtNPSN13/At3g17440*) ist ein Mitglied einer kleinen Untergruppe der 11 *soluble N-ethyl-maleimid sensitive factor attachment protein receptors* (SNAREs) der Qb-Unterfamilie von *Arabidopsis* (Zheng *et al.*, 2002; Uemura *et al.*, 2004). SNAREs sind eine Familie von Proteinen, die ähnliche Sekundärstrukturmerkmale aufweisen und in Vesikel-*trafficking* involviert sind. Neben der auch in *AtNPSN13* vorhergesagten Transmembranhelix im C-Terminus enthalten die meisten SNAREs eine zytosolische *coiled-coil* Domäne, die wichtig für die Interaktion mit anderen SNAREs ist. SNAREs wurden früher in v-SNAREs und t-SNAREs unterteilt, je nachdem ob sie in der Membran von Transportvesikeln oder in der Ziel- (*target*)-Membranen verankert sind. Da dies häufig schwer

⁹<https://www.genevestigator.ethz.ch/>

zu entscheiden ist, erfolgte eine neue Klassifizierung in Q(a, b, c) und R-SNAREs gemäß den Aminosäuren (Glutamat, Arginin), die im konservierten Interaktionsmotiv gefunden werden (Übersicht in Uemura *et al.*, 2004). Basierend auf GFP-Analysen, wurden *AtNPSN11*, -12 und -13 einer Gruppe von SNAREs zugeschrieben, die Transportprozesse zwischen der Plasmamembran (PM) und Endosomen regulieren (Fluoreszenz in der PM und in Endosomen). Die Identifikation von *AtNPSN13* als Teil des Plasmamembran-Proteoms (Marmagne *et al.*, 2004) bestätigt die Plasmamembran-Lokalisation. Für *NPS11* wurde eine Funktion bei der Formation der Zellplatte im Zuge der Zellteilung gezeigt (Zheng *et al.*, 2002). Wie in der Einleitung erwähnt, ist es durchaus vorstellbar, dass Zn in Endosomen innerhalb der Zelle transportiert wird. Diese Art des Transports wurde für Fe in Erythrozyten vorgeschlagen (Ponka *et al.*, 2002): Fe wird gemäß diesem sehr spekulativen Modell in Endosomen zu Mitochondrien transportiert und dort *ohne* Vesikelfusion durch Transporter in die Mitochondrien weitergeleitet. Die Fe-leeren Endosomen fusionieren daraufhin wieder mit der Zellmembran. Auch Zn könnte in *Arabidopsis* in Endosomen zur Vakuole transportiert werden, dort durch einen Transporter diese verlassen und direkt an *AtMTP3* übergeben werden. Wenn in der Membran der Endosomen *AtNPSN13* verankert ist – welches die Re-Fusion der Endosomen mit z. B. der Plasmamembran vermitteln könnte – wäre auch die Möglichkeit eines transienten Kontakts mit *AtMTP3* gegeben. Gegen eine funktionale Kopplung spricht das Expressionsmuster von *AtNPSN13*: laut ATGENEXPRESS und MPSS liegen in fast allen Geweben vergleichbare Transkriptmengen vor. Eine präferentielle Expression in Wurzeln ist nicht erkennbar – nur in Pollen sind die Transkriptmengen stark erhöht. Auch wenn eine funktionelle Verbindung zu diesem Zeitpunkt sehr spekulativ ist, erscheint *AtNPSN13* nichtsdestotrotz als Kandidat, der weiter untersucht werden sollte.

Für die Isoform 4 von Cyt b5 (*At2g32720*) gilt das schon bei der Isoform 1 (*At5g53560*) gesagte (s. S. 115), weshalb dieser Kandidaten sehr wahrscheinlich *kein* Interaktor von *AtMTP3* ist.

At5g37310 (*putatives Endomembran Protein 70*) wurde als Mitglied der Transmembran 9 Superfamilie (TM9SF) vorhergesagt (IPR004240⁹). Das Gründungsmitglied dieser Familie, *ScEMP70*, wurde in gereinigten Endosomen in Hefe gefunden. Es wird vermutet, dass die Mitglieder dieser Familie Kanäle oder Transporter für kleine Moleküle sind (Schimmöller *et al.*, 1998). Durch ARAMEMNON und INTERPRO wurden sieben Transmembranhelices und ein Export-Signalpeptid vorhergesagt. Von Bayer *et al.* (2006) wurde es mittels massenspektrometrischer Analyse als Bestandteil des Zellwand-Proteoms identifiziert. Die Funktion als mutmaßlicher Kanal oder Transporter der Plasmamembran bietet auch eine Erklärungsmöglichkeit für die deutlich erhöhte Zn-Sensitivität der *zrc cot1* Mutante, wenn diese *At5g37310* – allein oder zusammen mit *AtMTP3* – exprimieren (**Abbildung 3.10**). Entweder spezifisch oder unspezifisch könnte dies zu einer erhöhten Zn-Aufnahme der Hefezellen führen. Dies sollte durch ICP OES-Analysen bestätigt werden. Auch wenn eine aktive Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zn-Homöostase in Hefe und in der Pflanze für diesen Kandidaten identifiziert werden sollte, spricht die Lokalisierung eher gegen die Möglichkeit, dass *At5g37310* ein spezifischer

Interaktor von *AtMTP3* ist. Die laut ATGENEXPRESS in allen Geweben nahezu identischen Transkriptmengen von *At5g37310* – im Gegensatz zu *AtMTP3* – unterstützen diese Annahme.

Für *At4g27840* ist keine Funktion annotiert. Durch ARAMEMNON wurde eine C-terminale Transmembranhelix vorhergesagt und durch INTERPRO eine N-terminale Domäne, die Homologie zur Longin-Domäne von sog. Longins zeigt (IPR011012). Longins sind Mitglieder der R-SNARE-Familie. Der 150 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Domäne, die direkt vor dem *coiled-coil*-Motiv dieser SNAREs lokalisiert ist, wird eine regulatorische Funktion bei der SNARE-SNARE Interaktion zugeschrieben (Dietrich *et al.*, 2003). Obwohl *At4g27840* keine Homologie zu SNAREs zeigt und auch kein SNARE-typisches *coiled-coil*-Motiv durch INTERPRO gefunden wird, ist es möglich, dass es sich hierbei um ein membranverankertes Protein handelt, welches eine regulatorische Funktion auf SNARE-Interaktionen hat. Dies könnte auf eine Beteiligung im Rahmen eines auch für *AtNPSN13* vorgeschlagenen Modells des Zn-Transports in Endosomen hinweisen. Allerdings zeigt laut ATGENEXPRESS auch *At4g27840* wie *AtNPSN13* nahezu gleichmäßige Transkriptmengen in fast allen Geweben, mit stark erhöhten Transkriptmengen in Pollenstengeln. Dies wiederum lässt eine funktionelle Interaktion mit dem wurzelspezifisch exprimierten *AtMTP3* unwahrscheinlich erscheinen.

Mit *AtVHA-c*¹ (*At4g32530*) wurde eins der 26 Gene identifiziert, welche die 13 Untereinheiten der H⁺-ATPase der Vakuole kodieren (Sze *et al.*, 2002). Die c¹-Untereinheit wird von zwei Genen kodiert und ist Teil der aus fünf Untereinheiten bestehenden V₀-Intramembrankomponente. Durch die Aktivität der V-ATPase wird die Triebkraft für eine Reihe von Transportprozessen geliefert (Sze *et al.*, 2002) – unter anderem auch für die mutmaßlichen H⁺/Me²⁺-Antiporter *AtMTP1* und -3. Auch wenn dies für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Interaktion zwischen *AtMTP3* und *AtVHA* spricht, kann die Detektion einer (falsch-positiven-) Interaktion auch einfach auf eine Überrepräsentation der *AtVHA*-kodierenden Transkripte in der nicht-normalisierten cDNA-Bibliothek zurückgehen. Positiv zu werten ist, dass laut der ATGENEXPRESS-Daten *AtVHA-c*¹ wie *AtMTP3* hauptsächlich in der Wurzel exprimiert wird.

Bei der Aufteilung der *AtMTP3*-Kandidaten können – basierend auf der Wahrscheinlichkeit, dass es sich um echte *AtMTP3*-Interaktoren handelt – zusammenfassend vier Kategorien gebildet werden:

1. sehr wahrscheinlich: *At3g17440* (*AtNPSN13*), *At4g32530* (*AtVHA-c*¹)
2. wahrscheinlich: *At4g27500* (*AtPPI1*), *At4g27840*
3. nicht ausgeschlossen, aber unwahrscheinlich: *At3g45600* (*AtTET3*), *At5g37310* (putat. EMP70)
4. sehr unwahrscheinlich: *At2g32580*, *At1g24520* (*AtAGP1*), *At2g32720* (Cyt b5-4)

6.1.6 Zukünftige Experimente im Rahmen des Interaktionsscreens

Zunächst sollte die hier formulierte These bestätigt werden, dass die Tests auf die Stärke der Interaktionen aufgrund der veränderten Sequenz zwischen N_{ub}- und den identifizierten cDNA-Fragmenten

durch die Neuklonierung der Kandidaten mit negativen Ergebnis ausfielen. Die schnellste Möglichkeit hierfür ist die Klonierung der identifizierten C-terminalen Fragmente von At4g27500 und At5g37310 in pNubIGW mit dem Gateway[®]-System, da für diese beiden Kandidaten der entsprechende Interaktionstest mit den vollständigen Proteinen – mit negativen Ergebnis – bereits durchgeführt wurde (**Abbildung 3.9**). Die von pNubIGW kodierten Fusionsproteine aus N_{UBI} und den C-terminalen Fragmenten würden sich nur durch zwei fehlende Aminosäuren im *Linker* von den identifizierten Fusionsproteinen unterscheiden. Sollte beim hiermit durchgeführte Interaktionstest die Interaktion erwartungsgemäß angezeigt werden – für die nahezu identischen Konstrukte in pCUP-CGK war dies der Fall (**Abbildung 3.8**) – könnten die Stringenztests aller Kandidaten erneut und unter Verwendung der im Screen *identifizierten* Fragmente in pNubAGW und pNubGGW durchgeführt werden. Es bieten sich auch noch eine Reihe von anderen Experimenten in Hefe an, um die Interaktion der Kandidaten zu bestätigen. Bei Y2H-Systemen häufig angewandt wird der reziproke Austausch von *Prey*-Fragment und *Bait* für die Überprüfung einer Interaktion. Als biochemisches Experiment bietet sich die Co-Immunopräzipitation an (zur Erläuterung des Prinzips vergl. **Abschnitt 3.4**): Wie **Tabelle 3.3** zu entnehmen ist, liegen die meisten Kandidaten bereits mit N-terminalen HA-*Tag* im Vektor pFL613 vor. Daher kann schnell überprüft werden, ob beim Einsatz eines Anti-HA-Antikörpers höhermolekulare MTP/Kandidat-Komplexe detektiert werden. Die in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme bei der Bestätigung im SUS deuten darauf hin, dass die Konfiguration der eingesetzten Hybridproteine (Sequenz, *Linker*, N- oder C-terminale Fusionen) sehr kritisch für die Anzeige der Interaktion ist. Anstatt noch mehr Zeit auf die Bestätigung mit diesem heterologen System zu verwenden, erscheint es sinnvoller, die identifizierten Kandidaten direkt in *Arabidopsis* zu bestätigen. Dem SUS nahe verwandt ist das Split YFP-System (auch als *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) bezeichnet, Walter *et al.*, 2004): Auch hier werden Hybridproteine eingesetzt, nur das hierbei statt Ubiquitin das fluoreszierende Protein YFP *in planta* (bzw. in Protoplasten) rekonstituiert wird. Die Interaktion kann somit durch Konfokalmikroskopie visualisiert werden. Dieses System birgt allerdings die gleiche Gefahr wie beim SUS, dass tatsächliche Interaktionen durch die sterische Konfiguration der Hybridproteine fälschlicherweise nicht angezeigt werden. Um dieses Risiko zu minimieren sollten idealerweise alle vier Kombinationen der Fusion der YFP-Hälften an die *Bait*- und *Prey*-Proteine getestet werden (N_{YFP}-*Bait*, *Bait*-N_{YFP}, C_{YFP}-*Prey*, *Prey*-C_{YFP})¹⁰. Für einen ersten Versuch soll der Test nur mit den Fragmenten durchgeführt werden, die in der SUS-Bibliothek identifiziert wurden, wobei die C- bzw. N-terminale Fusion der YFP-Fragmente analog zu den im SUS eingesetzten *Bait*- und *Prey*-Proteinen erfolgen soll. Insofern hiermit die Interaktion *in planta* nicht bestätigt werden kann, ist die Durchführung des ausführlichen Tests nur für die wahrscheinlichsten Kandidaten (siehe oben) geplant. Schneller durchzuführen und mit weniger Gefahren der sterischen Inhibition von Interaktionen verbunden ist die Co-

¹⁰Marc Lohse, persönliche Kommunikation

Immunopräzipitation in Co-transformierten Protoplasten, weshalb dieses Experiment auch für weniger wahrscheinliche Kandidaten geplant ist. Wie beim Y2H-System besteht allerdings auch hier die Gefahr, dass Proteininteraktionen angezeigt werden, die auf durch die Überexpression der Kandidaten bedingte Aggregate oder gar *Inclusion bodies* zurückgehen und nicht auf reale funktionale Interaktionen. Um der Theorie des Metalltransports in Endosomen nachzugehen (*At3g17440/AtNPSN13* und *At4g27840*), soll auch untersucht werden, ob das Zytoskelett hierbei eine Rolle spielt. Hierfür sind biochemische (z. B. Inhibition des Myosinfunktion mit Wortmannin) und genetische (z. B. Einsatz von Zytoskelett-Mutanten) Methoden denkbar.

6.2 *AtMTP12* kodiert ein atyptisches CDF-Protein

Typische Mitglieder der CDF-Familie weisen sechs Transmembranhelices auf (Gaither und Eide, 2001). Die Amplifikation des 5'-Endes von *AtMTP12* mittels 5'-RACE zeigte, dass *AtMTP12* eine zusätzliche N-terminale, nicht-CDF-ähnliche Domäne besitzt, die acht bis zehn zusätzliche Transmembranhelices umfasst (**Abschnitt 4.1**). Um die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation alternativer Transkripte zu erhöhen, wurde für die Konstruktion der 5'-RACE-Bibliothek mRNA aus gepooltem Gewebe von unterschiedlich Metall-behandelten *A. thaliana*-Pflanzen isoliert. Dennoch konnte kein alternatives Transkript detektiert werden. Die MIPS-Annotation des *AtMTP12* (*At2g04620*)-ORF basiert somit auf einer falschen Vorhersage.¹¹ Eine N-terminale Verlängerung mit zusätzlichen 6 bis 9 putativen Transmembranhelices wurde auch in je einem Mitglied der CDF-Familie von *H. sapiens* (*ZnT5*), *S. cerevisiae* (*Msc2*) und *S. pombe* (*Accession* Nr. gi|9967708) gefunden. Die N-terminalen Domänen dieser Mitglieder zeigen keinerlei Homologie zueinander oder zur N-terminalen Domäne von *AtMTP12*. Von den vier genannten CDF-Proteinen werden nur für *HsZnT5* etliche (nicht-pflanzliche) hochhomologe Proteine gefunden, die wahrscheinlich in den entsprechenden Organismen die zu *HsZnT5* orthologen Proteine darstellen. Auch für *Msc2* aus *S. cerevisiae* existieren einige wenige moderat-homologe Proteine in anderen Pilzen wie *Candida glabra* und *Klyveromyces lactis*. Für *AtMTP12* wurde in *Oryza sativa* ein vorhergesagtes Protein identifiziert,¹² dass deutliche Homologie zu *AtMTP12* zeigt. In der N-terminalen Domäne bzw. der C-terminalen CDF-Domäne werden bei den beiden Proteinen 29 % bzw. 55 % identische Aminosäuren gefunden, was eine 42%igen Identität zwischen den vollständigen Proteinen ergibt. Für die N-terminale Domäne von *AtMTP12* werden keine weiteren homologen Sequenzen gefunden und durch INTERPRO wird keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinmotiven aufgezeigt. Von ARAMEMNON wird für *AtMTP12* mit einer Wahrscheinlichkeit von 51 % chloroplastidäre Lokalisierung vorhergesagt.

Weitere Untersuchungen von *AtMTP12* wurden erschwert durch das Fehlschlagen aller gewählten

¹¹*Accession* Nr. gi|20198214

¹²*Accession* Nr. gi|34904947

Strategien, *AtMTP12* in *E. coli* ohne gravierende Mutationen zu klonieren. Wie bereits in **Abschnitt 4.1** erläutert, könnte dies auf Promotoraktivität des 5'-Bereichs von *AtMTP12* aufgrund des hohen A/T-Gehalts (62 %) zurückgehen (Fakhfakh *et al.*, 1996). Hierdurch könnte unerwünschterweise ein potentiell toxisches Protein exprimiert werden. Für Membranproteine wird häufig Toxizität in *E. coli* gefunden, was mutmaßlich auf die Störung der Lipid-Doppelschicht – und der damit einhergehenden Undichtigkeit dieser Barriere – zurückgeht (Stewart *et al.*, 1998). Die *in vivo* Klonierung durch homologe Rekombination gelang letztendlich mit einem *Single-Copy* Vektor in Hefe – allerdings wird durch den verwendeten Vektor eine translationale Fusion mit *Ura3p* erzeugt. Bei Komplementationsexperimenten mit diesem sehr großen Fusionsprotein wurde keine Änderung der Sensitivität von *zrc1* gegenüber Co, Cu, Fe, Ni, Mn und Zn im Vergleich zur Leervektorkontrolle beobachtet. Die Expression des Fusionsproteins wurde hierbei durch die Komplementation der *URA3*-Auxotrophie des Hefestamms angezeigt. Es ist allerdings vorstellbar, dass durch die C-terminale Fusion von *AtMTP12* mit *Ura3p* eine putative Transportaktivität von *AtMTP12* gestört wird. Bei Verwendung des *Multi-Copy*-Vektor pFL61GW für die *in vivo* Klonierung in *msc2* und *zrc1* wurden keine *AtMTP12*-enthaltenden Hefe-Transformanten identifiziert. Die entsprechenden Komplementationsexperimente mit diesen Mutanten konnten daher nicht durchgeführt werden. Die Amplifikation des erfolgreich in Hefe (*in vivo*) erzeugten *AtMTP12*-Konstruktes in *E. coli* gelang nicht. Da die Klonierung von *AtMTP12* in binäre Pflanzenvektoren somit erheblich erschwert ist, erfolgte bisher keine weitere Charakterisierung von *AtMTP12*. Eine *A. thaliana* *Knockout*-Mutante existiert bisher ebenfalls nicht, was auf die physiologische Bedeutung dieses atypischen CDF-Proteins in der Pflanze hindeuten könnte.

Die zwei CDF-Proteine *ScMsc2* und *HsZnT5*, welche wie *AtMTP12* über eine zusätzliche N-terminale Domäne mit mehreren Transmembranhelices verfügen, wurden bereits eingehender analysiert (Ellis *et al.*, 2004, 2005; Suzuki *et al.*, 2005a,b). Obwohl beide Proteine im N-Terminus keinerlei Homologie zueinander aufweisen, scheinen sie ähnliche zelluläre Funktionen zu haben. *ZnT5* und *ZnT6* bilden demnach ein Hetero-Oligomer und transportieren Zn in das *trans*-Golgi Netzwerk (Suzuki *et al.*, 2005a). Es wurde durch die Autoren gezeigt, dass die Zn-Beladung – und somit Aktivierung – der extrazytosolisch über GPI-verankerten alkalischen Phosphatase kritisch von der Funktion dieser beiden Proteine abhängt. *ZnT7* transportiert ebenfalls Zn in das *trans*-Golgi Netzwerk – allerdings als Homo-Dimer (Suzuki *et al.*, 2005b). Ein ähnliches Heteromer wie durch *ZnT5/ZnT6* scheint auch durch die verwandten CDF-Proteine *Msc2p* und *Zrg17p* gebildet zu werden (Ellis *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass diese beiden Proteine Zn in das ER transportieren und den Phänotyp der *msc2* Mutante synergistisch komplementieren. Die heterologe Expression von *ZnT5* und *ZnT6* in *msc2* komplementierte ebenfalls deren Phänotyp, aber nicht die Expression von *ZnT5* oder *ZnT6* alleine. Die ähnliche Funktion dieser phylogenetisch nur entfernt verwandten Proteine aus *H. Sapiens* und *S. cerevisiae* deutet darauf hin, dass auch *AtMTP12* eine entsprechende Funktion im Zusammenspiel mit einem weiteren CDF in *A. thaliana* haben könnte. Die durch ATGENEXPRESS und MPSS angezeigten Transkript-

mengen deuten darauf hin, dass *AtMTP12* nahezu ubiquitär in der gesamten Pflanze exprimiert wird. Nur in Pollen werden keine nennenswerten Transkriptmengen gefunden, wohingegen im Hypocotyl, im Rosetten-Xylem und in der Wurzelhaarzone erhöhte Transkriptmengen vorliegen.

6.3 *AtMTP2* ist im Endomembransystem der Zelle lokalisiert und vermittelt in Hefe Zn- und Co-Detoxifizierung

Aus dem Einfluss von *AtMTP2* auf die Metalltoleranz verschiedener Hefe-Mutanten (**Abschnitt 4.2.1**) wurde geschlossen, dass *AtMTP2* hauptsächlich Zn-, aber auch Co- und in sehr geringerem Maße Fe-Detoxifizierung vermittelt. Diese Metalle sind bekannte Substrate für eine Reihe prokaryotischer oder eukaryotischer CDF-Proteine (Haney *et al.*, 2005; Gaither und Eide, 2001). Die verfügbaren Daten legen nahe, dass CDF-Proteine generell zweiwertige Übergangsmetalle von der zytoplasmatischen Seite einer Membran auf die extrazytoplasmatische Seite transportieren (Gaither und Eide, 2001). Insofern stellte sich die Frage, ob die erhöhte Zn und Co-Toleranz durch Export aus der Zelle vermittelt wird oder durch Sequestrierung in ein intrazelluläres Kompartiment. In der Aminosäuresequenz von *AtMTP2* befindet sich direkt nach dem Start-Methionin ein XXRR-Motiv, das häufig bei ER-residenten Proteinen gefunden wird (Teasdale und Jackson, 1996). Allerdings konnte keines der zehn von Aramemom abgefragten Programme eine eindeutige Vorhersage bezüglich der subzellulären Lokalisierung treffen. Um der Frage der subzellulären Lokalisierung experimentell nachzugehen wurden N- und C-terminale Fusionen von *AtMTP2* mit EGFP in Hefe, *A. thaliana*-Protoplasten und in stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen exprimiert. Hierbei wurde für EGFP-Fusionen am C-Terminus von *AtMTP2* sowohl in Hefe als auch in Protoplasten und in stabil transformierten Pflanzen ein für ER-Lokalisierung typisches Netzwerk beobachtet (**Abschnitt 4.12** und **4.13**). Bei der N-terminalen Fusion von EGFP an *AtMTP2* wurde in pflanzlichen Zellen auch in vakuolären Membranen ein deutliches Signal detektiert. Auch wenn bisher über das *Targeting* von Membranproteinen zu ihren Zielmembranen wenig bekannt ist, könnte dies mit der Maskierung des XXRR-Motivs durch das fusionierte EGFP erklärt werden. Es ist bekannt, dass die N-oder C-terminale Fusion von Proteinen Signalsequenzen maskieren kann, weshalb GFP alternativ auch innerhalb eines Proteins inseriert werden kann (Tian *et al.*, 2004). Bei Membranproteinen bietet sich hierfür eine vorhergesagte zytoplasmatische Domäne an.

Aufgrund der EGFP-Fusionen ist nicht endgültig zu entscheiden, ob *AtMTP2* ausschließlich im ER lokalisiert ist. Auch im Fall der C-terminalen Fusionen sind zum Teil vesikuläre Strukturen zu erkennen (**Abbildung 4.13**). Neuere Erkenntnisse machen deutlich, dass das Konzept von klar unterscheidbaren Organellen entlang des *secretory pathway*, die durch vorwärts und rückwärts gerichtete Vesikel versorgt werden, möglicherweise keine genaue Wiedergabe der Situation in der Zelle ist (Hawes und Satiat-

Jeunemaitre, 2005). Vielmehr scheinen die membranumhüllten Kompartimente des ER, des Golgi-Systems und des *trans*-Golgi-Netzwerks durch ein dynamischen Membrankontinuum verbunden zu sein. Hierbei wird eine zunehmende »Reifung« des sekretorischen Systems in Richtung der Plasmamembran beobachtet, was sich unter anderem durch diverse Gradienten (Metabolit, pH-Wert) und durch die Differenzierung von Proteinen und Membranen kennzeichnet. Auch wenn das native Ziel eines neusynthetisierten Membranproteins die vakuoläre- oder Plasmamembran ist, besteht die Möglichkeit der Detektion des Proteins auch in allen Kompartimenten entlang des *secretory pathway* auf dem Weg zur Zielmembran. Idealerweise ist die Akkumulation des Proteins am Ort seiner biologischen Aktivität am höchsten, aber es ist nicht auszuschließen, dass die Akkumulation in mehreren Kompartimenten eine biologische Funktion hat (z. B. Bereithaltung des Proteins für den Zeitpunkt des Bedarfs). Tatsächlich sind solche multisubzellulär lokalisierten Proteine bekannt (Silva-Filho, 2003). Allerdings handelt es sich bei den meisten bekannten Proteinen nicht um Proteine des *secretory pathway*, sondern um solche, die gleichzeitig zu Mitochondrien und Chloroplasten geleitet werden. Für einige Proteine wurde beobachtet, dass sich die Lokalisierung in Abhängigkeit von externen Stimuli ändert. Eine hierdurch erreichte posttranslationale Regulation wurde bei Cu- und Zn-Aufnahmesystemen beobachtet: Endozytose dieser Aufnahmesystemen trat bei Cu bzw. Zn defizienten Zellen nach der Wiederversorgung mit diesen Metallen im Fall des Cu-Transporters *HsCRT1* bzw. im Fall der Maus-Zn-Transporter *MmZIP1*, -2, -3 und -4 auf (Petris *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Dies wurde auch bei Hefe-Homologen beobachtet (Gitan *et al.*, 1998; Gitan und Eide, 2000; Pena *et al.*, 2000). Durch diese Regulation wird vermutlich sichergestellt, dass die Zelle nach der Wiederversorgung nicht mit diesen Metallen überflutet wird. Diesem Konzept folgend ist es durchaus vorstellbar, dass *AtMTP2* sowohl in Membranen des ER akkumuliert, transient in Golgi Stapeln lokalisiert ist, aber auch in den Membranen von prevakuolären Vesikeln und der Vakuole akkumuliert. Wie in **Abschnitt 4.2.2** gezeigt wurde, wird *AtMTP2* nur bei Zn-Defizienz in der Wurzelspitze exprimiert. Zur Überprüfung, ob sich die Lokalisation von *AtMTP2* in Abhängigkeit von einem Zn-Stimuli ändert, wurden Zn-defiziente *p35S::EGFP-MTP2* und *p35S::MTP2-EGFP* Pflanzen auf Zn-Überschuss-Medien transferiert. Es konnte allerdings keine deutlich sichtbare Änderung der Lokalisation festgestellt werden. Bevor weitreichende Schlüsse aus der subzellulären Lokalisation von *AtMTP2* gezogen werden, sollte diese allerdings mit alternativen Methoden überprüft werden (**Abschnitt 6.5**) – unter anderem mit den nun verfügbaren Pflanzen, die EGFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors exprimieren. Bisher kann somit keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Zn- und Co-Toleranz von Hefe hauptsächlich durch Transport dieser Metalle in das ER oder in die Vakuole oder in beide Kompartimente vermittelt wird. Die Vermutung, dass alle CDF-Proteine einem H^+/Me^{2+} Antiport-Mechanismus folgen (**Abschnitt 1.2.3**), lässt die Frage aufkommen, ob die durch *AtMTP2* vermittelte Zn-Toleranz tatsächlich durch Zn-Transport in das ER erklärt werden kann. Für eukaryotische Zellen wurde etabliert, dass der pH-Wert im ER nahezu neutral ist (pH = 7,2) und zudem die Mem-

bran des ER hochdurchlässig für H^+ ist (Kim *et al.*, 1998; Paroutis *et al.*, 2004). Entlang des *secretory pathway* nimmt der pH-Wert bis zu einem Wert von ≈ 6 im *trans*-Golgi Netzwerk ab. Die Identifizierung von ER-lokalisierten Mitgliedern der CDF-Familie (z. B. Msc2 und Zrg17, Ellis *et al.*, 2005) belegt, dass der Transport über diese Membran möglich ist. Entweder deutet dies auf einen H^+ -unabhängigen Transportmechanismus oder der aktive Transportkomplex befindet sich in Sektionen des ER, die in Richtung der Abspaltung von Golgi-Cisternen bereits saurer als pH 7,2 sind (s. oben und Modell in Paroutis *et al.*, 2004). Hierbei ist interessant, dass für die *S. cerevisiae*-CDF-Proteine der vakuolären Membran Zrc1 und Cot1 gezeigt wurde, dass sie auf ihrem Weg durch das System des *secretory pathway* Zn in das ER transportieren (Ellis *et al.*, 2004). Bei diesen CDF-Mitgliedern wird davon ausgegangen, dass es H^+/Me^{2+} Antiporter sind (MacDiarmid *et al.*, 2002). Allerdings ist trotz eines mittlerweile existierenden molekularen Modells für den H^+/Me^{2+} Antiport-Mechanismus prokaryotischer CDF-Proteine (Haney *et al.*, 2005; Wei und Fu, 2006) nach wie vor unklar, ob alle CDF-Mitglieder denselben Transportmechanismus haben, ob der Austausch auch gegen andere Kationen als H^+ erfolgen kann (z. B. K^+ im Fall von CzcD, Guffanti *et al.*, 2002) und welche Rolle das Membranpotential $\Delta\psi$ spielt. Auch in *S. pombe* wurde mit Zhf ein ER-lokalisiertes Mitglied der CDF-Familie identifiziert (Clemens *et al.*, 2002), welches aber eine grundsätzlich andere Funktion als Msc2/Zrg17 hat. Diese Protein transportiert wie *AtMTP2* Zn und Co, aber auch Cd. Es wurde gezeigt, dass die Zn- und Co-Hypersensitivität von *zhf* auf die Unfähigkeit dieser Mutante zurückgeht, das ER als Speicher für überflüssiges Zn und Co zu nutzen. Damit wurde gezeigt, dass das ER in *S. pombe* trotz seiner zellulären Schlüsselfunktion bei der Proteinsynthese als Speicher für diese Metalle genutzt werden kann. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass dies nicht für Cd zutrifft. Die toxische Wirkung dieses ebenfalls von Zhf transportierten Substrates nimmt vielmehr mit steigender Cd-Konzentration im ER zu. Im Gegensatz zur *zhf* Mutante wurde bei *msc2* und *zrg17* keine erhöhte Zn-Sensitivität beobachtet (Ellis *et al.*, 2005, 2004). Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Transportmechanismen mit unterschiedlicher Triebkraft sein. Allerdings könnte es auch auf fundamentale Unterschiede in der Funktion oder der Aufgabenverteilung der subzellulären Kompartimente in *S. pombe* und *S. cerevisiae* zurückzuführen sein. Zur Überprüfung der Annahme, dass die erhöhte Zn-Toleranz von *zrc1 cot1* auf den Zn-Transport in das ER durch *AtMTP2* zurückgeht, wurde *AtMTP2* in der *msc2*-Mutante exprimiert. Diese Mutante zeigt bei niedrigen Zn-Konzentrationen eine deutlich ausgeprägtere *Unfolded Protein Response* (UPR) als der Wildtypstamm, was durch Transformation mit Msc2 komplementiert wurde (Ellis *et al.*, 2005, 2004). Heterologe Expression von *AtMTP2* in dieser Mutante komplementierte allerdings die Zn-Defizienz-induzierte UPR nicht (**Abbildung 4.5**). Dies ist verwunderlich, da bisher alles darauf hindeutete, dass Zn durch *AtMTP2* in Hefe in das Endomembransystem transportiert wird. Diese Resultate sollten daher durch heterologe Expression von *AtMTP2* in der *zhf*-Mutante von *S. pombe* überprüft werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass *AtMTP2* wie in *Arabidopsis* auch in Hefe partiell in der vakuolären Membran lokalisiert ist und nur hier Transportaktivität zeigt. Möglicherwei-

se wird für die Aktivität der im ER lokalisierten *AtMTP2*-Proteinfraktion die Interaktion mit einem unbekanntem *A. thaliana* Protein benötigt – analog zum aktiven Msc2/Zrg17 Heteromer-Transportkomplex in Hefe. In Erweiterung des in **Abschnitt 6.2** Gesagtem, könnte *AtMTP12* in *A. thaliana* das zu *ScMsc2*-orthologe Protein sein und *AtMTP2* könnte das *A. thaliana*-Orthologe von *ScZrg17* sein. Dies ist allerdings rein spekulativ und kann für *AtMTP2* noch weniger anhand von Sequenzhomologien belegt werden als für *AtMTP12*. Auch die Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den CDFs aus Hefe, Menschen und *Arabidopsis* als phylogenetischer Baum liefert keine Hinweise (**Abbildung A.1**).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die erhöhte Zn- und Co-Toleranz der Hefemutanten auf die Speicherung dieser Metalle durch *AtMTP2* im ER zurückgehen *könnte*, aber die Ergebnisse mit der *msc2*-Mutante eher für Transport in ein anderes Endomembransystem sprechen. Obwohl die subzelluläre Lokalisierung von *AtMTP2* nicht vollständig geklärt werden konnte, zeichnen sich für *AtMTP2* zwei in den nächsten Kapiteln erörterte mögliche Funktionen in der Pflanze ab.

6.4 *AtMTP1*, -2 und -3 erfüllen spezifische Funktionen in der Wurzel der Pflanze.

In der Einleitung wurde die Frage aufgeworfen, ob die 12 Mitglieder der CDF-Familie in *A. thaliana* redundante Funktionen erfüllen oder ob jedes Mitglied eine spezifische Funktion hat. Für *AtMTP1* und *AtMTP3* wurde bereits gezeigt, dass die Funktionen der beiden Transporter nur teilweise überlappen (s. **Abschnitt 1.2.3**, Arrivault *et al.*, 2006; Krämer, 2005). Für die Wurzel ergibt sich demnach folgendes Bild: *AtMTP1* wird in jungen aktiven Geweben wie der meristematischen Zone und der Elongationszone der Wurzel bei allen externen Zn-Konzentrationen in gleichem Maße exprimiert. Die gezeigte Zn-Transportaktivität und die Lokalisation in der vakuolären Membran lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass *AtMTP1* in diesen Geweben zwei Funktionen erfüllt: Zum ersten sorgt es mutmaßlich für den Aufbau eines vakuolären Zn-Speichers, den die reife Zelle jederzeit re-mobilisieren kann. Für Samen wurde gezeigt, dass NRAMP3 und -4 die Rolle der Zn-Mobilisierung aus der Vakuole bei der Samenkeimung übernehmen (Lanquar *et al.*, 2005). Bisher ist nicht bekannt, ob auch in anderen Geweben die Mobilisierung von vakuolärem Zn durch Mitglieder der NRAMP Familie erfolgt. Aufgrund des Transports von Zn in die Vakuole kann *AtMTP1* auch vor Zn-Überschuss schützen. Abhängig von der Stabilität dieses Proteins, ist es durchaus möglich, dass es diese Funktion auch noch in älteren Zellen hat, in denen keine Promotoraktivität festgestellt wurde. Für *AtMTP1* wurde bisher nicht untersucht, in welchen Zelltypen der transkriptionsaktiven Wurzelzonen der *pMTP1*-Promotor aktiv ist. Bei der Erstellung der Bilder in **Abbildung 4.9** wurde der Eindruck gewonnen, dass *AtMTP1* hier in allen acht Zellschichten exprimiert wird, was für eine Primärfunktion von *AtMTP1* beim Auf-

bau eines Speichers für ein essentielles Metall in jungen Zellen spricht. In **Abbildung 4.9** ist deutlich zu erkennen, dass bei Zn-Überschuss die *pMTP3*-Promotoraktivität in der Zone der Wurzel erkennbar wird, in der mit zunehmender Distanz zum Wurzelapex die *pMTP1*-Promotoraktivität zum Erliegen kommt: in der Wurzelhaarzone. Von Arrivault *et al.* (2006) wurde weiterhin gezeigt, dass *pMTP3*-Promotoraktivität nur in Epidermis- und Kortezellen der Wurzel auftritt. Folglich übernimmt *AtMTP3* möglicherweise in Epidermis- und Kortezellen der restlichen Wurzel bei Zn-Überschuss die Aufgabe von *AtMTP1*, weiterhin Zn in die Vakuole zu transportieren und damit das Zytoplasma vor hohen Zn-Konzentrationen zu schützen. Nach den Expressionsdaten der heterologen Expression in Hefe zu urteilen, kann *AtMTP3* – im Gegensatz zu *AtMTP1* – auch verstärkt Co transportieren. Dies unterstützt die Annahme, dass die primäre Rolle von *AtMTP3* die Detoxifizierung von Zn im Zytoplasma ist. Aufgrund der durch diesen Prozess vermittelten Zn-Immobilisierung in der Wurzel, also der Entfernung von Zn aus dem Transportweg in Richtung Xylem, wird vermutlich unerwünschter Transport in den Spross unterbunden Arrivault *et al.* (2006).

AtMTP2 ist nach Kenntnis des Autors das erste bekannte CDF-Gen, dessen Expression nur bei Zn-Mangel induziert wird. Anhand von Reporterlinien konnte Promotoraktivität nur unter Zn-Defizienz und nur in zwei Zonen von Wurzelspitzen festgestellt werden (**Abbildung 4.9**). Wie für *AtMTP3* legen die Hefe-Expressionsdaten nahe, dass *AtMTP2* Zn und Co transportiert. In Anbetracht der möglichen subzellulären Lokalisierung im ER wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch *AtMTP2* Schutz beim Übergang von Zn-Defizienz auf Zn-Überschuss-Bedingungen (»Zn-Schock«) gewährleistet wird: In Hefe wurde beobachtet, dass hierfür zwei Regulationsmechanismen existieren: Zum einen wird das Haupt-Zn-Aufnahmesystem Zrt1 durch Endozytose aus der Plasmamembran entfernt (Gitan *et al.*, 2003, s. auch oben) und zum anderen wird das im Übermaß in die Zelle einströmende Zn durch Zrc1 in die Vakuole weitergeleitet (MacDiarmid *et al.*, 2003) und somit detoxifiziert. Ein mögliches Szenario wäre, dass die Expression von *AtMTP2* in Vorbereitung auf einen solchen Zn-Schock erfolgt und das hierbei in die Zelle im Übermaß einströmende Zn durch Transport ins ER detoxifiziert wird. In Anbetracht der Bedeutung des ER für die Zelle kann nicht davon ausgegangen werden, dass das ER die selbe Zn-Akkumulationskapazität wie die Vakuole hat. Allerdings erscheint es insbesondere nach Wachstum unter Zn-Mangelbedingungen plausibel, dass im ER für den Fall eines Zn-Schocks genug Zn-Aufnahmekapazität vorhanden ist. Die mögliche Funktion des ER bei der Co- und Zn-Detoxifizierung wird durch die Entdeckung eines solchen Mechanismus in *S. pompe* unterstützt (Clemens *et al.*, 2002). Im Falle des Zutreffens dieser Zn-Schock-Hypothese sollte die *mtp2-S3*-Mutante unter Zn-Schock-Bedingungen Wachstumsnachteile gegenüber dem Wildtyp haben. Hauptproblem bei diesen Experimenten, bei denen das Wurzellängenwachstum quantifiziert wurde, waren unkontrollierbare Zn-Kontaminationen. Wenngleich in zwei Experimenten deutlich Zn-Schock beobachtet werden konnte, war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bei der Reaktion auf Zn-Schock zu erkennen (**Abschnitt 4.2.6**). Bei diesen zwei Experimenten wurde allerdings ein starker Wachstumsun-

terschied zwischen Wildtyp und Mutante beim Wachstum unter Zn-Defizienz beobachtet. Das deutlich schlechtere Wachstum des Wildtyps war bei allen Folgeexperimenten nicht mehr so ausgeprägt, wobei bisher nicht mit Sicherheit geklärt werden konnte, ob der Wachstumsunterschied tatsächlich nur bei starker Zn-Defizienz auftritt und nur aufgrund der Zn-Kontaminationen nicht so deutlich reproduziert werden konnte. Ein weiterer möglicher Erklärungsgrund könnte unterschiedliche »Fitness« der Wildtyp- und *mtp2-S3*-Samen sein, obwohl diese zum selben Zeitpunkt unter identischen Bedingungen erzeugt wurde. Unterschiedliche Fitness der Samen könnte auch auf eine Erkrankung der Mutterpflanzen zurückzuführen sein, aber auch z. B. die Behandlung bei der Sterilisation der Samen hat hierauf einen Einfluss. Unabhängig hiervon stellte sich aufgrund des großen Einflusses von Zn-Kontaminationen auf das Wurzellängenwachstum heraus, dass die Quantifizierung des Wurzellängenwachstum zu fehleranfällig als Basis für die Charakterisierung eines Zn-Schock-Phänotyps ist. Daher sollen bei zukünftigen Experimenten andere molekulare Marker für den Stress der Zelle unter Zn-Defizienz- sowie Zn-Schock-Bedingungen gemessen werden.

Zum Zeitpunkt der Verfolgung der Zn-Schock-Hypothese war allerdings noch nicht bekannt, in welchen Zelltypen der Wurzelspitze *AtMTP2* exprimiert ist. Im Fall der Zn-Detoxifizierung unter den Bedingungen eines Zn-Schocks ist zu erwarten, dass dieselben Zelltypen geschützt werden müssen wie bei Zn-Überschuss. *AtMTP3*, dessen Hauptfunktion der Schutz für übermäßigen Zn-Konzentrationen ist, wird in epidermalen- und Kortezellen exprimiert. Im Gegensatz hierzu zeigte die Expression von N- und C-terminalen *AtMTP2/EGFP*-Fusionskonstrukten in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen unter Kontrolle des nativen Promotors, dass die Expression von *AtMTP2* ausschließlich auf die Epidermis beschränkt ist (*I-M* und *Q-S* in **Abbildung 4.13**). In der meristematischen Zone der Wurzel überdeckt sich der Bereich der *pMTP1*- und *pMTP2*-Promotoraktivität nahezu. Insofern *AtMTP1* in dieser Zone translatiert wird und tatsächlich in allen acht Zellschichten aktiv ist (vergl. oben), spricht gegen die Bedeutung von *AtMTP2* bei einem Zn-Schock das Argument, dass *AtMTP1* diese Funktion übernehmen könne und möglicherweise auch bei Zn-Schock überschüssiges Zn in die Vakuole transportiert. Der Schutz aller Zelltypen im Fall zu hoher Zn-Konzentrationen erscheint in Anbetracht des in dieser Zone noch nicht ausgebildeten Casparischen Streifens sinnvoll: erst durch die Ausbildung des Casparischen Streifens in nichtwachsenden Wurzelzonen unterliegt der Wasser- und Nährstofftransport – mutmaßlich auch der Zn-Transport – in den Zentralzylinder der Kontrolle und Selektion der Endodermiszellen (Taiz und Zeiger, 2002a), wodurch vermutlich bei zu hohen Zn-Konzentrationen die Zellen innerhalb der Endodermis geschützt sind.

Aufgrund dieser Informationen ist auch eine andere als die »Zn-Schock«-Funktion für *AtMTP2* vorstellbar: Die Stelle der Aufnahme von Mineralien in der Wurzel wird kontrovers diskutiert und hängt zum Teil vom Mineral als auch von der Pflanzenspezies ab (Taiz und Zeiger, 2002b). Generell ist die Aufnahme von Ionen in der Wurzelhaarzone am größten. Die meristematische Zone kann nicht über das Xylem mit Mineralien versorgt werden, da Wasser und Mineralien im Xylem nur nach oben

transportiert werden können. Insofern auch das Protophloem in dieser Region nicht in der Lage ist die dort befindlichen Zellen mit Zn zu versorgen, müssen diese Zellen die benötigten Mineralien selbst aus der Umgebung aufnehmen. Wie schon erwähnt, ist in der Zone zwischen Wurzelkappe und Elongationszone ist noch keine Endodermis ausgebildet. Durch die Ausbildung des Casparischen Streifen in ausgewachsenen Zellen können Mineralien nicht im Apoplast in den Zentralzylinder eindringen. Die freie Bewegung von aufgenommenen Mineralien ist allerdings vom Wurzelapex bis zur Differenzierungszone möglich, wodurch sich hier jede Zelle durch die Aufnahme von frei im Apoplast diffundierenden Ionen selbst versorgen kann. Weiter Aufwärts ist dies nicht mehr möglich: alle Zellen außerhalb des Casparischen Streifens haben zwar nach wie vor Zugang zu in die Wurzel eindringenden, frei beweglichen Ionen im Apoplast, aber für die Versorgung von Zellen innerhalb der Endodermis muss jedes Ion zumindest einmal in den Symplast aufgenommen werden. Danach kann es über Plasmodesmen weiter im Symplast von Zelle zu Zelle geleitet werden oder es wird wieder in den Apoplast innerhalb des Zentralzylinders abgegeben, z. B. auch im Xylem. Die Aufnahmefähigkeit der Wurzel wird durch zwei Faktoren bestimmt: Durch die Wurzeloberfläche und durch die Fähigkeit zu wachsen. Wächst eine Wurzel zu langsam, sinkt die Konzentration von bioverfügbaren Mineralien in der Wurzelumgebung schnell, wenn durch Diffusion nicht mit derselben Geschwindigkeit Mineralien aus umgebenden Erdbereichen nachströmen. Obwohl in der umgebenden Erdschichten genug Mineralien vorhanden sein könnten, entsteht hierdurch lokal um die Wurzel eine Defizienz. Sinkt z. B. die Konzentration von bioverfügbaren Zn – entweder durch langsames Wurzelwachstum, durch Umwelteinflüsse oder durch Wachstum der Wurzel in eine Erdschicht ohne Zn – hat dieser Zn-Mangel seine größte Wirkung wahrscheinlich in sich teilenden, elongierenden und ausreifenden Zellen der Wurzelspitze, also in jungen transkriptionsaktiven Zellen, die viele Zn-benötigende Proteine synthetisieren müssen. In solchen Zellen wurde auch für *AtMTP1* Promotoraktivität gezeigt (Desbrosses-Fonrouge *et al.*, 2005, **Abbildung 4.9**). Da *AtMTP1* hier wahrscheinlich auch aktiv ist, kann hierdurch Zn – möglicherweise auch unerwünscht – in die Vakuole transportiert werden. Eine weitere Möglichkeit des Verlusts von Zn unter Zn-Mangelbedingungen liegt in der Zn-Bindungskapazität des Apoplasten: Dieser Raum zwischen den Zellen besteht hauptsächlich aus Zellwänden und nimmt zwischen 5 und 20 % des gesamten Gewebevolumens ein und Wasser kann in diesem Raum frei diffundieren. Aufgrund der enorm großen wasserzugänglich Oberfläche der Zellwände bietet der Apoplast eine große Zahl unspezifischer Zn-Bindungsstellen. Dies führt zu einer weiteren Senkung der ohnehin schon niedrigen Zn-Konzentration. Unter Zn-Mangelbedingungen kann in der Region zwischen Wurzelapex und der Zone des ausgebildeten Casparischer Streifens vermutlich jede Zelle Zn durch *High Affinity* Aufnahmesysteme der ZIP-Familie aus dem Apoplast aufnehmen. Bevor dieses Zn im ER angelangt, besteht wiederum die Möglichkeit der Zn-Verknappung durch die enorme Zn-Bindungskapazität des Zytoplasmas. Für Hefe und Säugerzellen wurde gezeigt, dass das ER ein Ort erhöhten Zn-Bedarfs ist: So wird z. B. in β -Zellen des Pankreas Zn für die Zusammensetzung von Proinsulin zu Homohexameren im ER be-

nötigt (Huang und Arvan, 1995). GPI-verankernde Enzyme (GPI-Phosphoethanolamintransferasen) sind ER-residente Enzyme, die wie alle Mitglieder der Superfamilie der alkalischen Phosphatasen Zn im aktiven Zentrum tragen (Galperin und Jedrzejas, 2001; Mann *et al.*, 2004). Scj1p, ein DnaJ-homologes ER-residentes Chaperon aus Hefe, hat zwei Zinkfinger-Motive und benötigt vermutlich Zn für seine Funktion (Linke *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2004). Es ist davon auszugehen, dass auch Pflanzen für Zn-Beladung ER-residenter Zn-Metalloproteine und von Zn-Metalloenzymen des *secretory pathway* Zn im ER benötigen. Möglicherweise wird unter Zn-defizienten Bedingungen durch *AtMTP2* die Zn-Versorgung des ER in den beiden *AtMTP2*-expressionsaktiven Wurzelzonen (**Abbildung 4.9** und **4.13**) gewährleistet: Mutmaßlich sinkt in radialer Richtung hin zum Wurzelzentrum die ohnehin niedrige Konzentration aufgrund des Verlusts im Apoplasten sowie durch die zelluläre Zn-Aufnahme. Epidermalen Zellen steht demnach von allen Zelltypen in diesen Wurzelzonen vermutlich das meiste Zn zur Aufnahme zur Verfügung. In einem solchen Szenario könnte *AtMTP2* das in die epidermalen Zellen aufgenommene Zn in das ER weiterleiten. Zn könnte dann innerhalb des ER über *Desmotubules*¹³ von Zelle zu Zelle gelangen. Hierdurch wäre möglicherweise die Versorgung des ERs aller Zellen in den Wurzelzonen gewährleistet, in denen *AtMTP2* in epidermalen Zellen aktiv ist. Es ist auch vorstellbar, dass durch ein bisher unbekanntes, ausschließlich Epidermis-spezifisches zelluläres Zn-Aufnahmesystem – höchstwahrscheinlich der ZIP-Familie – alles in der Umgebung der Wurzel befindliche Zn aufgenommen wird, dieses durch *AtMTP2* in das ER transportiert wird und die Zn-Versorgung aller nicht-epidermalen Zellen ausschließlich über das ER verfolgt: Wenn alles Zn von epidermalen Zellen aufgenommen wird und mithin kein Zn den Apoplasten erreicht, besteht auch nicht die Gefahr des Zn-Verlusts durch Bindung an biologisch nicht essentielle Bindungsstellen im Apoplasten. Beim Modell, das Zn ausschließlich über das ER verteilt wird, müsste angenommen werden, dass Zn-Transport im ER effizienter erfolgt, als über den Symplast. Dies ist durchaus möglich, da bei der Zn-Verteilung im ER die Gefahr des Zn-Verlusts durch *AtMTP1* vermittelten Transport in die Vakuole nur in epidermalen Zellen besteht. Andererseits ist ein solcher Verlust hypothetisch, da unter Bedingungen der Zn-Defizienz *AtMTP1* auf Proteinebene inaktiviert werden könnte. Bei beiden Auslegungen des Modells wird zumindest im ER die Zn-Beladung von Zn-benötigenden Proteinen gewährleistet, was ein entscheidender Beitrag zur Aufrechterhaltung des Wurzellängenwachstums sein könnte. Die Sicherstellung des Wurzellängenwachstums könnte bei bestimmten Mineralmangelbedingungen – möglicherweise bei Vernachlässigung aller anderen Prozesse – die höchste Priorität haben: Hierdurch versucht die Pflanze den Erdbereich des Mangels schnell zu durchwachsen, um wieder Zonen mit erhöhten Mineralkonzentrationen zu erreichen. Dies wurde in dieser Arbeit sehr deutlich bei Zn-Mangel beobachtet (**Abbildung 4.23**) und ebenso deutlich bei Cu-Mangel, der durch *Knockout* des Kupferaufnahmesystems COPT1 erzeugt wurde (Sancenon *et al.*, 2004). Im Vergleich zu Kontroll-

¹³*Desmotubules* sind ER-Schläuche innerhalb von Plasmodesmen (Oparka und Roberts, 2001)

bedingungen wurde unter Zn-Defizienz fast die doppelte Wurzellänge erreicht. Trotz des verstärkten Wurzellängenwachstums ist in **Abbildung 4.23** die Zn-Defizienz der Pflanzen anhand der geringen Biomasse der oberirdischen Pflanzenteile und dem deutlich Zn-defizienten Erscheinungsbild der Blätter zu erkennen.

Die vorgeschlagene Rolle von *AtMTP2* bei der Zn-Verteilung unter Zn-Mangelbedingungen wird durch das Muster der Expression von *AtMTP2* in der Wurzel unterstützt: Promotoraktivität wird hauptsächlich in epidermalen Zellen der meristematischen Zone der Wurzelspitze beobachtet (**Abbildung 4.7**, **4.9** u. **4.13**), die sich durch junge isodiametrische Zellen mit einer hohen Proteinsyntheserate kennzeichnet (Scheres *et al.*, 2002). In diesen Abbildungen ist auch zu erkennen, dass die GUS-Aktivität bzw. die EGFP-Fluoreszenz in einigen Fällen auch ein wenig in die Elongationszone hineinreicht. Warum in der verbleibenden Elongationszone *keine* Promotoraktivität detektiert wird, aber am Anfang der darauf folgenden Wurzelhaarzone, erscheint beim vorgeschlagenen Modell der Funktion von *AtMTP2* nicht offensichtlich. Dieses Muster konnte mit den Pflanzen, welche EGFP-Fusionen mit *AtMTP2* unter Kontrolle des nativen Promotors exprimierten, bisher nicht beobachtet werden (*I-L* u. *Q-S* in **Abbildung 4.13**). Dies lag an der geringen Anzahl von unabhängigen Pflanzen der T₁-Generation (jeweils ≈ 3 pro Fusionskonstrukt), die in diesem Experiment nach der Antibiothikaselektion Zn-defizient gemacht werden konnten: Bei jeder dieser Pflanzen wurden wiederum nur zwei bis drei Wurzelspitzen mit Expressionsaktivität gefunden, die fast alle zu kurz waren, um beide Wurzelzonen klar zu unterscheiden (vergl. *I-L* u. *Q-S* in **Abbildung 4.13**). Da das GUS-Protein N-terminal mit den ersten zwei Transmembranhelices von *AtMTP2* fusioniert ist (**Abschnitt 2.3**), ist es nicht unwahrscheinlich, dass die GUS-Proteine eine ähnliche Stabilität wie die *AtMTP2*-GFP-Fusionsproteine haben und bei weiteren Experimenten mit den EGFP-Linien dasselbe Expressionsmuster wie für die GUS-Linien gefunden wird. Auf Grundlage der *pMTP2::GUS*-Experimente bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die Existenz von zwei transkriptionsaktiven Wurzelzonen an:

1. Der *pMTP2* Promotor wird täglich nur einmal angeschaltet und die Distanz zwischen den beiden Zonen geht auf das Wachstum in der Zwischenzeit zurück. Dass teilweise keine *pMTP2*-Promotoraktivität in der meristematischen Zone beobachtet wurde (**Abbildung 4.7** u. **4.9**), könnte darauf zurückgehen, dass die Transkriptionsaktivität der verschiedenen Wurzelspitzen nicht vollständig synchronisiert ist. In diesem Fall müsste es rein statistisch in einigen Fällen allerdings auch Promotoraktivität zwischen den beiden beobachteten Zonen geben, was nicht der Fall war.
2. In der Elongationszone ist die Verteilung von Zn im ER möglicherweise unerwünscht, da hierdurch Zn auch an Zellen verloren gehen würde, die in dieser Zone zu (totem) Xylem differenzieren. In der beginnenden Wurzelhaarzone wird *AtMTP2* dann evtl. nur kurz wieder angeschaltet, um das ER der sich ausdifferenzierenden Wurzelzellen wieder mit Zn zu versorgen.
3. Möglicherweise wird in der Elongationszone nicht soviel Zn für die Synthese von Metallopro-

teinen im ER benötigt, da die Zellelongation hauptsächlich durch Aufnahme von Wasser mit Vergrößerung der Vakuole und durch Wachstum der Zellwand charakterisiert ist. Eventuell wurden alle Zn-benötigenden Proteine, die für die Synthese der Zellwand und von Lipiden während der Zellelongation benötigt werden bereits vor dem Eintritt der Zellen in die Elongationszone synthetisiert.

4. Da die Wurzelhaarzone die Zone der beginnenden verstärkten Mineralaufnahme ist, könnte durch die Aktivität von *AtMTP2* in dieser Zone eine Minimalversorgung des ER mit Zn gewährleistet werden, dass über andere Systeme in der gesamten Wurzel verteilt werden kann. *AtMTP2* wird nur in wurzelhaartragenden Trichoblasten exprimiert, also in Zellen, die aufgrund der stark vergrößerten Oberfläche mehr Wasser und Nährstoffe aufnehmen können. Eine Erklärung warum *AtMTP2* nur in der beginnenden Wurzelhaarzone exprimiert wird, aber nicht höher, könnte mit dem Wachstum der Wurzel durch Zn-armes Medium (/Erde) zusammenhängen: Aufgrund dieses Wachstum wird evtl. durch die Wurzelspitze nahezu alles umgebende Zn aufgenommen, wodurch die oberen Wurzelzonen von nahezu Zn-freiem Medium umgeben werden. Wenn wiederum kein Zn in die epidermalen Zellen einströmt, kann auch kein Zn in das ER weitertransportiert werden. Die meristematische Zone stellt evtl. das einzige zusätzliche Gewebe dar, wo Zn-Aufnahme in das ER essentiell ist. In den Zellen der Elongationszone könnte noch genug Zn und *AtMTP2*-Protein von dem Zeitpunkt vorhanden sein, als sich diese Zellen noch in der meristematischen Zone befanden (*R* in **Abbildung 4.13**), so dass keine zusätzliche Transkription nötig ist.

Gegen die Bedeutung von *AtMTP2* bei der Aufrechterhaltung des Wurzelelongationswachstums bei Zn-Defizienz spricht allerdings, dass für die *mtp2-S3* Mutante in keinem Fall ein geringeres Wurzellängenwachstum im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurden. Die Stärke der erreichten Zn-Defizienz kann aufgrund der unbekanntenen Zn-Kontamination bei den meisten Wurzelwachstumsexperimenten nicht abgeschätzt werden kann (**Abbildung 4.24**). Nichtsdestotrotz zeigt **Abbildung 4.23**, dass Wildtyp- und *mtp2-S3*-Pflanzen zumindest in diesem Experiment ausreichend Zn-defizient waren, um verstärktes Wurzelwachstum zu zeigen. Auch in diesem Fall wurde – im Widerspruch zur Erwartung – tendenziell eher besseres Wachstum der *AtMTP2-Knockout*-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen beobachtet.

6.5 Zukünftige Experimente im Rahmen der Charakterisierung von *AtMTP2*

Alle beiden vorgeschlagenen Modelle zur biologischen Funktion von *AtMTP2*, das Zn-Schock-Modell und das Modell der Zn-Aufnahme und Verteilung über das ER, sind zu diesem Zeitpunkt durch

experimentelle Daten weder bestätigt noch widerlegt. Sie bieten allerdings Anhaltspunkte für zukünftige Experimente. Zunächst sollte die subzelluläre ER-Lokalisierung von *AtMTP2* überprüft werden. Pflanzen, die *AtMTP2*-Fusionen mit EGFP unter Kontrolle des nativen Promotors exprimieren, wurden bisher nur in der T₁-Generation nach Anzucht in Gegenwart eines Antibiotika-Selektionsmarkers und späterem Transfer auf Medium ohne Antibiotika und ohne zugegebenes Zn analysiert. Vermutlich weil hierdurch in vielen Wurzelspitzen keine ausreichende Zn-Defizienz erzeugt werden konnte, wurde nur in wenigen Individuen Fluoreszenz beobachtet. Die Verfügbarkeit von Pflanzen der T₂-Generation ermöglicht die direkte Anzucht auf Medium ohne Zn und ohne Antibiotika.¹⁴ Bei diesen Experimenten kann leichter überprüft werden, ob auch bei Expression unter Kontrolle des nativen *pMTP2*-Promotors die Lokalisation unabhängig von kurzfristigen Änderungen der Zn-Konzentration im Medium ist. Um mehr Sicherheit bezüglich der subzellulären Lokalisierung zu gewinnen, sollte in Protoplasten und Hefe noch die Co-Lokalisation mit Markern für das ER erfolgen. Bisher existieren keine überzeugenden Fluoreszenzfarbstoffe für das ER,¹⁵ weshalb für diese Experimente fluoreszenzmarkierte Proteine benutzt werden sollten. Die subzelluläre Lokalisierung auf Grundlage von GFP-Fusionen ist allerdings mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, die zum einen auf den unbekanntem Einfluss der GFP-Fusion auf die Lokalisation zurückgeht und zum anderen auf die Interpretation der Fluoreszenz-Bilder (Heazlewood *et al.*, 2005). Bei Abfrage der SUBA-Datenbank nach GFP-lokalisierten Proteinen wurden für 155 von 1093 Proteinen zwei unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen gefunden, für 11 Proteine drei und für drei Proteine sogar vier. Einige dieser multisubzellulären Lokalisierungen sind sicher real und ein Teil der scheinbar widersprüchlichen Daten haben sicher biologische Bedeutung. Die Erkenntnisse von Heazlewood *et al.* zeigen jedoch klar, dass mehrere Methoden zur Lokalisation eines Proteins kombiniert werden sollten, um Sicherheit zu erlangen. Als alternative Methode könnte die Bestätigung der ER-Lokalisation immunozytochemisch erfolgen (Satiat-Jeunemaitre und Hawes, 2001). Voraussetzung hierfür ist allerdings ein funktionaler Antikörper, der für *AtMTP2* bisher nicht existiert. Alternativ könnte eine Fusion von *AtMTP2* mit einem kurzen *Tag* – z. B. mit HA – erzeugt werden. Nach der Transformation von Protoplasten könnte mit einem Antikörper gegen HA die Markierung des Proteins *in situ* erfolgen. Allerdings besteht auch bei immunohistochemischen Methoden die Gefahr der fehlerhaften Lokalisierung aufgrund der vielen notwendigen Schritte.

Essentiell für die Überprüfung der vorgeschlagenen Modelle der Funktion von *AtMTP2* ist ein *mtp2*-Phänotyp sowie die Komplementation dieses Phänotyps durch *AtMTP2*. Neben der homozygoten *mtp2-S3* Mutante wurde inzwischen eine zweite mutmaßliche *Knockout*-Linie (GK-851F09-025842) in die T₃-Generation propagiert. Zudem liegen Samen der F₂-Generation der Rückkreuzung

¹⁴In der Präsenz von Antibiotika keimten Pflanzen ohne Zn nicht (Abschnitt 2.6.3)

¹⁵Das positiv geladene Molekül DiOC6(3) (Dihexaoxacarbocyaniniodid) wird hierfür benutzt, akkumuliert allerdings aufgrund des stärker negativen Membranpotentials von Mitochondrien bei niedrigen Konzentrationen zunächst in diesen und erst bei höheren Konzentrationen im ER. In fixierten Zellen färbt DiOC6 alle intrazellulären Membranen (Hawes und Satiat-Jeunemaitre, 2005).

von *mtp2-S3* Mutante mit Col-0 vor. Hiermit sollte die Grundlage gegeben sein, einen identifizierten Phänotyp eindeutig dem *Knockout* von *AtMTP2* zuzuschreiben oder dies auszuschließen. Wenn *AtMTP2* eine essentielle Funktion bei der Aufnahme von Zn in das ER unter Zn-Defizienz hat, ist sehr wahrscheinlich, dass für *mtp2* stärkere Zn-Mangelsymptome auftreten, als beim Wildtyp. Wie für Hefe wurde auch in *Arabidopsis* eine *Unfolded Protein Response* (UPR) identifiziert, allerdings bisher nur als Antwort auf Tunicamycin- und DTT-induzierten Stress (Martinez und Chrispeels, 2003) und nicht als Antwort auf Zn-Defizienz im ER. Zudem sind keine Promotorelemente wie in Hefe bekannt (UPR *Elements*, UPR_E), die UPR-Gene eindeutig kennzeichnen. Daher ist zum jetzigen Zeitpunkt schwer abzuschätzen, ob sich in *Arabidopsis* die Analyse der Transkriptmengen der vermutlich UPR-induzierten Gene eignet, das Ausmaß von Zn-Mangel im ER zu quantifizieren. Von Ina Talke durchgeführte Affymetrix Genechip[®]-Experimente zeigen (nicht publiziert), dass zumindest von einem UPR-Gen, BiP3, die Transkription auch unter Zn-Defizienz hochreguliert wurde. Als alternative Methode zur Überprüfung der Theorie, dass *AtMTP2* essentiell für die Zn-Beladung von Proteinen im ER ist, könnte man auch direkt die Enzymaktivität von vermutlich im ER mit Zn beladenen Enzymen *in vivo* messen. Ein häufig als vakuolärer Marker genutztes Enzym ist α -Mannosidase (Wilden und Chrispeels, 1983). Der Zn-Bedarf dieses Enzyms ist seit langem bekannt (Snaith und Levvy, 1968) und geht wahrscheinlich bei allen Mitgliedern dieser Familie auf die aktive Beteiligung von Zn am katalytischen Mechanismus zurück (van den Elsen *et al.*, 2001). Isoformen wurden entlang des *secretory pathway* in Golgi-Stapeln, in der Vakuole und der Zellwand gefunden (Wilden und Chrispeels, 1983; van den Elsen *et al.*, 2001). Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die Zn-Beladung dieser Isoformen bereits direkt nach der Synthese im ER erfolgt. Daher ist es vorstellbar, dass unter Zn-defizienten Bedingungen Unterschiede in der α -Manosidase-Aktivität zwischen Wurzel-Proteinextrakten von *mtp2-S3*-Pflanzen und Wildtyppflanzen bestehen könnten.

Die meisten Übergangsmetalle lösen bei zu hohen Konzentrationen oxidativen Stress aus (Stohs und Bagchi, 1995), wohingegen für Zn im tierischen und bakteriellen System eine antioxidative Wirkung gezeigt wurde (Stohs und Bagchi, 1995; Bray und Bettger, 1990). Für Zn wurde vielmehr gezeigt, dass Zn-Defizienz oxidativen Stress auslöst, der durch Wiederversorgung mit Zn behoben werden kann (Bray und Bettger, 1990; Tate Jr. *et al.*, 1999; Oteiza *et al.*, 2000). Es wurde durch Hammermueller *et al.* (1987) demonstriert, dass bei Zn-Defizienz H₂O₂ vom NADPH-abhängigen Cytochrom P450 entweicht. Umgekehrt wurde für *B. subtilis* gezeigt, dass erhöhte Zn-Konzentrationen das Wachstum unter oxidativem Stress (Behandlung der Zellen mit H₂O₂) verbesserten (Rijstenbil *et al.*, 1994). Die antioxidative Wirkung von Zn basiert vermutlich auf der Verdrängung von Redox-aktiven Metallen von Bindungsstellen, an denen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können (Stohs und Bagchi, 1995). Andererseits gibt es Hinweise, dass in Pflanzen phytotoxische Zn-Konzentrationen ebenfalls oxidativen Stress auslösen (Cuyppers *et al.*, 2001). Oxidativen Stress könnte man anhand der Lipidperoxidation messen und vergleichen, ob unter Zn-Defizienz oder unter Zn-Schock Unterschiede zwi-

schen *mtp2-S3* und dem Wildtyp bestehen.

Für die Untersuchung der Regulation von *AtMTP2*-Transkriptmengen in Zusammenarbeit mit Ina Talke und Marc Hanikenne wurden Wildtyppflanzen unter verschiedenen Bedingungen (-Zn, +Zn, hoch Cd, hoch Co, hoch Mn, -Mn, hoch Fe, -Fe) hydroponisch angezogen. Es ist geplant hiermit die Transkriptmengen von *AtMTP2* und einem Markergen für Zn-Defizienz wie *AtZIP4* unter diesen Bedingungen zu bestimmen. Hiermit soll überprüft werden, ob die Transkription von *AtMTP2* tatsächlich nur durch Zn-Defizienz hochreguliert wird. Aufgrund der engen Verknüpfung des gesamten Metallhomöostasenetzes ist es vorstellbar, dass auch nicht-Zn-Behandlungen sekundär Einfluss auf die Expression von *AtMTP2* haben. So wurde z. B. für *AtIRT1* gezeigt, dass Zn-Überschuss sekundär zu Fe-Defizienz führt (Connolly *et al.*, 2002, s. **Abschnitt 1.2**). Neben diesen Experimenten soll mit bereits vorliegendem Material (Stéphanie Arrivault) die gewebspezifische Transkription von *AtMTP2* überprüft werden. Weiterhin wurden *mtp2-S3*-Pflanzen unter Zn-Defizienz hydroponisch angezogen. In dieser Mutante, sowie in der zweiten verfügbaren *mtp2*-Mutante (nach der Identifikation von homozygoten Pflanzen) sollen mittels q-RT-PCR die Transkriptmengen von verschiedenen Genen im Vergleich zum Wildtyp überprüft werden:

1. mutmaßliche Zn-Aufnahme- und Verteilungssysteme: *IRT3*, *ZIP4*, *ZIP3*, *ZIP9*
2. Gene der Chelatorsynthese: *NAS2*, *NAS4*
3. Zn-Export- und Verteilungssysteme: *HMA2*, *-3*, *-4*; *MTP1*, *-3*, *-4* und 8
4. UPR-Gene: *BIP2*, *BIP3*, *DER1-like*
5. andere Metallhomöostasegene: *IRT1* (Fe-Aufnahme), *FER1* (Fe-Speicher)
6. Stressmarker bei Zn-Zugabe: At2g26150, *HSP101*

Die Quantifizierung der Transkripte dieser Gene ermöglicht Rückschlüsse auf Unterschiede im zellulären Metallstatus von *mtp2-S3*- und Wildtyppflanzen unter Zn-Defizienz. Sollte z. B. *AtMTP2* tatsächlich Zn in das ER transportieren, ist es vorstellbar, dass UPR-Gene bei Zn-Defizienz in der *Knockout*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich stärker transkribiert werden. Die Quantifizierung von Proteinen der Fe-Aufnahme und Speicherung könnte helfen aufzuklären, ob *AtMTP2* einen Einfluss auf die Fe-Homöostase hat: Für eine solche Möglichkeit spricht erstens, dass eine Beteiligung eines *A. thaliana*-CDFs Proteins (*AtMTP3*) an der Fe-Homöostase bereits gezeigt wurde (Arrivault *et al.*, 2006) und zweitens zeigte *AtMTP2* einen leichten Einfluss auf die Fe-Sensitivität einer Hefe-Mutante (**Abbildung 4.4**).

Bisher nicht durchgeführt aber geplant ist die Bestimmung des Elementgehalts (insbes. Zn) in Wurzeln von *mtp2-S3*- und Wildtyppflanzen mittels ICP OES, nachdem die Pflanzen auf Zn-freien Medien angezogen wurden.

6.6 Die ETV-Kopplung mit der ICP OES eignet sich als Hochdurchsatzmethode

Die entwickelte Methode zur Analysen von Pflanzenmaterial ohne Säure-Aufschluss wurde bisher nur in relativ kleinem Maßstab getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die erreichte Messgenauigkeit im Rahmen der etablierten Probenverflüssigungsmethode ist (s. **Tabelle 5.2**). Somit eignet sich die Methode gut für die Bestimmung von Elementgehalten in pflanzlichen Proben, insbesondere wenn für das Screening des Elementgehalts von Pflanzenpopulationen nur relative Gehalte von Interesse sind. Der Hauptvorteil ist die prinzipbedingte Erhöhung der Analysesensitivität der ICP OES durch die Kopplung mit der ETV: während für die Analyse von verflüssigten Proben mind. 20 mg Material benötigt werden, sind beim Probeneintrag mit der ETV 0,1–0,5 mg ausreichend. Ebenfalls von Vorteil ist der deutlich geringere Arbeitsaufwand und der erhöhte Probendurchsatz pro Zeiteinheit. Lahner *et al.* (2003) zeigten, dass auch ohne mikrowellenbeschleunigten Probenaufschluss mit HNO_3 in kurzer Zeit und mit guter Reproduzierbarkeit pflanzliche Proben aufgeschlossen und analysiert werden können. Allerdings wurde hier ein deutlich sensitiveres ICP-MS-Analysegerät verwendet, wodurch nur ≈ 5 mg statt 20 bis 200 mg bei Analysen mit der ICP OES verflüssigt werden müssen. Schwachpunkte der hier vorgestellten Methode sind die möglicherweise gekoppelten Probleme der Quantifizierung von Ca und die kurze Lebensdauer der benutzten Graphitrohre. Daher ist in einem zukünftigen Experiment geplant, die mutmaßliche Bildung von CaC_2 durch Senkung der maximalen Probenverdampfungstemperatur und durch Modulation der zugegebenen Freon-Menge zu verhindern.

Literaturverzeichnis

- Abdel-Ghany S.E., Burkhead J.L., Gogolin K.A., Andrés-Colás N., Bodecker J.R., Puig S., Peñarubia L. and Pilon M.** (2005a). AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett* **579**(11), 2307–2312. doi:10.1016/j.febslet.2005.03.025
- Abdel-Ghany S.E., Müller-Moulé P., Niyogi K.K., Pilon M. and Shikanai T.** (2005b). Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**(4), 1233–1251. doi:10.1105/tpc.104.030452
- Alexandersson E., Saalbach G., Larsson C. and Kjellbom P.** (2004). *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol* **45**(11), 1543–1556. doi:10.1093/pcp/pch209
- Alonso J.M., Hirayama T., Roman G., Nourizadeh S. and Ecker J.R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**(5423), 2148–2152. doi:10.1126/science.284.5423.2148
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Lisse 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**(5633), 653–657. doi:10.1126/science.1086391
- Andres-Colas N., Sancenon V., Rodrigues-Navarro S., S. M., Thiele D., Ecker J., Puig S. and Penarrubia L.** (2006). The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* **45**, 225–236. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02601.x
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S., Huffman D.L. and O'Halloran T.V.** (2001). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J Biol Chem* **276**(44), 41365–41376. doi:10.1074/jbc.M104807200
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Molteni E., Huffman D.L. and O'Halloran T.V.** (2002). Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures. *Genome Res* **12**(2), 255–271. doi:10.1101/gr.196802
- Arrivault S., Senger T. and Krämer U.** (2006). The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *Plant J* **46**(5), 861–879. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02746.x

- Axelsen K.B. and Palmgren M.G.** (2001). Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**(2), 696–706.
- Axelsen K.B., Venema K., Jahn T., Baunsgaard L. and Palmgren M.G.** (1999). Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase AHA2: mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry* **38**(22), 7227–7234. doi:10.1021/bi982482l
- Bach M.L., Lacroute F. and Botstein D.** (1979). Evidence for Transcriptional Regulation of orotidine-5'-phosphate Decarboxylase in Yeast by Hybridization of mRNA to the Yeast Structural Gene Cloned in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(1), 386–390.
- Bae M.S., Cho E.J., Choi E.Y. and Park O.K.** (2003). Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J* **36**(5), 652–663. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01907.x
- Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Finney L.A., Outten C.E. and O'Halloran T.V.** (2002). A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118). *J Mol Biol* **323**(5), 883–897. doi:10.1016/S0022-2836(02)01007-0
- Bartel P., Chien C., Sternglanz R. and Fields S.** (1993). *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, chapter Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions, pages 153–179. Oxford University Press, Oxford U.K.
- Baulcombe D.C., Saunders G.R., Bevan M.W., Mayo M.A. and Harrison B.D.** (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**(6068), 446–449. doi:10.1038/321446a0
- Baunsgaard L., Venema K., Axelsen K.B., Villalba J.M., Welling A., Wollenweber B. and Palmgren M.G.** (1996). Modified plant plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase with improved transport coupling efficiency identified by mutant selection in yeast. *Plant J* **10**(3), 451–458. doi:10.1046/j.1365-313X.1996.10030451.x
- Bayer E.M., Bottrill A.R., Walshaw J., Vigouroux M., Naldrett M.J., Thomas C.L. and Maule A.J.** (2006). *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* **6**(1), 301–311. doi:10.1002/pmic.200500046
- 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**(2), 251–268. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01959.x
- Benavente L. and Alonso J.** (2006). Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *MOLECULAR BIOSYSTEMS* **2**, 165–173. doi:10.1039/b513874d
- Blaudez D., Kohler A., Martin F., Sanders D. and Chalot M.** (2003). Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* **15**(12), 2911–2928. doi:10.1105/tpc.017541

- Blum H., Beier H. and Gross H.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99. doi:10.1002/elps.1150080203
- Borgese N., D'Arrigo A., Silvestris M.D. and Pietrini G.** (1993). NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **325**(1-2), 70–75. doi:10.1016/0014-5793(93)81416-W
- Borner G.H.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**(2), 568–577. doi:10.1104/pp.103.021170
- Borner G.H.H., Sherrier D.J., Stevens T.J., Arkin I.T. and Dupree P.** (2002). Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A genomic analysis. *Plant Physiol* **129**(2), 486–499. doi:10.1104/pp.010884
- Bovet L., Eggmann T., Meylan-Bettex M., Polier J.E., Kammer P., Marin E., Feller U. and Martinoia E.** (2003). Transcript level of AtMRPs after cadmium treatment: induction of AtMRP3. *Plant Cell Environ* **26**, 371–381. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.00968.x
- Brachmann C.B., Davies A., Cost G.J., Caputo E., Li J., Hieter P. and Boeke J.D.** (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**(2), 115–132. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brandizzi F., Frangne N., Marc-Martin S., Hawes C., Neuhaus J.M. and Paris N.** (2002). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* **14**(5), 1077–1092. doi:10.1105/tpc.000620
- Bray T.M. and Bettger W.J.** (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* **8**(3), 281–291. doi:10.1016/0891-5849(90)90076-U
- Brenner S., Johnson M., Bridgham J., Golda G., Lloyd D.H., Johnson D., Luo S., McCurdy S., Foy M., Ewan M., Roth R., George D., Eletr S., Albrecht G., Vermaas E., Williams S.R., Moon K., Burcham T., Pallas M., DuBridge R.B., Kirchner J., Fearon K., Mao J. and Corcoran K.** (2000). Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* **18**(6), 630–634. doi:10.1038/76469
- Cardon G., Höhmann S., Klein J., Nettesheim K., Saedler H. and Huijser P.** (1999). Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene* **237**(1), 91–104. doi:10.1016/S0378-1119(99)00308-X
- Cardon G.H., Höhmann S., Nettesheim K., Saedler H. and Huijser P.** (1997). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J* **12**(2), 367–377. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.12020367.x

- Causier B. and Davies B.** (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* **50**(6), 855–870. doi:10.1023/A:1021214007897
- Chao Y. and Fu D.** (2004). Kinetic study of the antiport mechanism of an Escherichia coli zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem* **279**(13), 12043–12050. doi:10.1074/jbc.M313510200
- Chen O.S. and Kaplan J.** (2000). CCC1 suppresses mitochondrial damage in the yeast model of Friedreich's ataxia by limiting mitochondrial iron accumulation. *J Biol Chem* **275**(11), 7626–7632. doi:10.1074/jbc.275.11.7626
- Cheng N.H. and Hirschi K.D.** (2003). Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing *Arabidopsis* protein that associates with CAX1. *J Biol Chem* **278**(8), 6503–6509. doi:10.1074/jbc.M210883200
- Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T. and Hirschi K.D.** (2002). Characterization of CAX4, an *Arabidopsis* H(+)/cation antiporter. *Plant Physiol* **128**(4), 1245–1254. doi:10.1104/pp.010857
- Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T., Lachmansingh J., LeClere S., Lahner B., Salt D.E. and Hirschi K.D.** (2005). Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol* **138**(4), 2048–2060. doi:10.1104/pp.105.061218
- Chinchilla D., Merchan F., Megias M., Kondorosi A., Sousa C. and Crespi M.** (2003). Ankyrin protein kinases: a novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Mol Biol* **51**(4), 555–566. doi:10.1023/A:1022337221225
- Chu C.C., Lee W.C., Guo W.Y., Pan S.M., Chen L.J., Li H.m. and Jinn T.L.** (2005). A Copper Chaperone for Superoxide Dismutase That Confers Three Types of Copper/Zinc Superoxide Dismutase Activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**(1), 425–436. doi:10.1104/pp.105.065284
- Clemens S.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**(4), 475–86.
- Clemens S., Bloss T., Vess C., Neumann D., Nies D.H. and Zur Nieden U.** (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* **277**(20), 18215–18221. doi:10.1074/jbc.M201031200
- Clough S.J. and Bent A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**(6), 735–743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Cnops G., Neyt P., Raes J., Petrarulo M., Nelissen H., Malenica N., Luschnig C., Tietz O., Dintengou F., Palme K., Azmi A., Prinsen E. and Lijsebettens M.V.** (2006). The TORNADO1 and TORNADO2 genes function in several patterning processes during early leaf development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18**(4), 852–866. doi:10.1105/tpc.105.040568
- Colangelo E.P. and Guerinot M.L.** (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* **9**(3), 322–330. doi:10.1016/j.pbi.2006.03.015

- Conklin D.S., Culbertson M.R. and Kung C.** (1994). Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **244**(3), 303–311. doi:10.1007/BF00285458
- Conklin D.S., McMaster J.A., Culbertson M.R. and Kung C.** (1992). COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**(9), 3678–3688.
- 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**(6), 1347–1357.
- Cormack B.P., Bertram G., Egerton M., Gow N.A., Falkow S. and Brown A.J.** (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143** (Pt 2), 303–311.
- Cosio C., Martinoia E. and Keller C.** (2004). Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. *Plant Physiol* **134**(2), 716–725. doi:10.1104/pp.103.031948
- 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**(38), 23469–23472.
- Curie C., Panaviene Z., Loulergue C., Dellaporta S.L., Briat J.F. and Walker E.L.** (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**(6818), 346–349. doi:10.1038/35053080
- Cuypers A., Vangronsveld J. and Clijsters H.** (2001). The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* **39**(7-8), 657–664. doi:10.1016/S0981-9428(01)01276-1
- Daram P., Urbach S., Gaymard F., Sentenac H. and Cherel I.** (1997). Tetramerization of the AKT1 plant potassium channel involves its C-terminal cytoplasmic domain. *EMBO J* **16**(12), 3455–3463. doi:10.1093/emboj/16.12.3455
- Davis S.J. and Vierstra R.D.** (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol* **36**(4), 521–528. doi:10.1023/A:1005991617182
- De Buck S., Jacobs A., Van Montagu M. and Depicker A.** (1999). The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* **20**(3), 295–304. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00602.x
- Desbrosses-Fonrouge A.G., Voigt K., Schröder A., Arrivault S., Thomine S. and Krämer U.** (2005). *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Lett* **579**(19), 4165–4174. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.046
- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S. and Marco Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13), 8024–8029. doi:10.1073/pnas.1230660100

- DiDonato R. J. J., Roberts L.A., Sanderson T., Easley R.B. and Walker E.L.** (2004). *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* **39**(3), 403–414. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02128.x
- Dietrich L.E.P., Boeddinghaus C., LaGrassa T.J. and Ungermann C.** (2003). Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta* **1641**(2-3), 111–119. doi:10.1016/S0167-4889(03)00094-6
- Dohmen R.J., Stappen R., McGrath J.P., Forrov H., Kolarov J., Goffeau A. and Varshavsky A.** (1995). An Essential Yeast Gene Encoding a Homolog of Ubiquitin-activating Enzyme. *J Biol Chem* **270**(30), 18099–18109. doi:10.1074/jbc.270.30.18099
- Dräger D.B., Desbrosses-Fonrouge A.G., Krach C., Chardonnens A.N., Meyer R.C., Saumitou-Laprade P. and Kramer 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**(3), 425–439. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02143.x
- Ebbs S.D., Lasat M.M., Brady D.J., Cornish J., Gordon R. and Kochian L.V.** (1997). Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *J Environ Qual* **26**(5), 1424–1430.
- Eide D.J.** (1998). The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr* **18**, 441–469.
- Eide D.J.** (2000). Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Microb Physiol* **43**, 1–38.
- Ellis C.D., Macdiarmid C.W. and Eide D.J.** (2005). Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J Biol Chem* **280**(31), 28811–28818. doi:10.1074/jbc.M505500200
- Ellis C.D., Wang F., MacDiarmid C.W., Clark S., Lyons T. and Eide D.J.** (2004). Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol* **166**(3), 325–335. doi:10.1083/jcb.200401157
- Eren E. and Arguello J.M.** (2004). *Arabidopsis* HMA2, a Divalent Heavy Metal-Transporting PIB-Type ATPase, Is Involved in Cytoplasmic Zn²⁺ Homeostasis. *Plant Physiol* **136**, 3712–3723. doi:10.1104/pp.104.046292
- Fakhfakh H., Vilaine F., Makni M. and Robaglia C.** (1996). Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J Gen Virol* **77**, 519–523.
- Finney L.A. and O'Halloran T.V.** (2003). Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**(5621), 931–936. doi:10.1126/science.1085049
- Friedman N., Ninio M., Pe'er I. and Pupko T.** (2002). A structural EM algorithm for phylogenetic inference. *J Comput Biol* **9**(2), 331–353. doi:10.1089/10665270252935494

- Friese K.C., Wätjen U. and Grobecker K.H.** (2001). Analyte transport efficiencies in electrothermal vaporization for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* **370**(7), 843–849. doi:10.1007/s002160100865
- Friso G., Giacomelli L., Ytterberg A.J., Peltier J.B., Rudella A., Sun Q. and van Wijk K.J.** (2004). In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* **16**(2), 478–499. doi:10.1105/tpc.017814
- Fukuchi-Mizutani M., Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T. and Ohta D.** (1999). Microsomal Electron Transfer in Higher Plants: Cloning and Heterologous Expression of NADH-Cytochrome b5 Reductase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **119**(1), 353–362.
- Gadella T.W.J., van der Krogt G.N. and Bisseling T.** (1999). GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci* **4**(7), 287–291. doi:10.1016/S1360-1385(99)01426-0
- Gaither L.A. and Eide D.J.** (2001). Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* **14**(3–4), 251–270. doi:10.1023/A:1012988914300
- Galperin M.Y. and Jedrzejewski M.J.** (2001). Conserved core structure and active site residues in alkaline phosphatase superfamily enzymes. *Proteins: Struct, Funct, Genet* **45**(4), 318–324. doi:10.1002/prot.1152
- Garcia O., Bouige P., Forestier C. and Dassa E.** (2004). Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol* **343**(1), 249–265. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.093
- Ghosh M., Shen J. and Rosen B.P.** (1999). Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9), 5001–5006. doi:10.1073/pnas.96.9.5001
- Gilbert Berben Jacques Dumont V.G.P.A.B.F.H.** (1991). The YDp plasmids: A uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**(5), 475–477. doi:10.1002/yea.320070506
- Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q., Bennett S.C. and Muchowski P.J.** (2005). A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. *Nat Genet* **37**(5), 526–531. doi:10.1038/ng1542
- Gitan R.S. and Eide D.J.** (2000). Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* **346 Pt 2**, 329–336.
- Gitan R.S., Luo H., Rodgers J., Broderius M. and Eide D.** (1998). Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**(44), 28617–28624.
- Gitan R.S., Shababi M., Kramer M. and Eide D.J.** (2003). A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* **278**(41), 39558–39564. doi:10.1074/jbc.M302760200

- Güldener U. and Hegemann J.** (1998). A second generation of GFP-vectors for subcellular localization studies in budding yeast. Technical report, Heinrich-Heine Universität, Inst. für Mikrobiologie.
- Goswami T., Bhattacharjee A., Babal P., Searle S., Moore E., Li M. and Blackwell J.M.** (2001). Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. *Biochem J* **354**(Pt 3), 511–519.
- Gravot A., Lieutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A. and Richaud P.** (2004). AtHMA3, a plant P(1B)-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett* **561**(1-3), 22–28. doi:10.1016/S0014-5793(04)00072-9
- 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**(12), 7220–7204.
- Guedry O., Lazard M., Delort F., Dauplais M., Grigoras I., Blanquet S. and Plateau P.** (2003). Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **270**(11), 2486–2496. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03620.x
- Guerinot M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**(1-2), 190–198. doi:10.1016/S0005-2736(00)00138-3
- Guffanti A.A., Wei Y., Rood S.V. and Krulwich T.A.** (2002). An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K⁺ and H⁺. *Mol Microbiol* **45**(1), 145–153. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02998.x
- Guo H. and Ecker J.R.** (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr Opin Plant Biol* **7**(1), 40–49. doi:10.1016/j.pbi.2003.11.011
- Guo W.J., Bundithya W. and Goldsbrough P.** (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* **159**, 369–381. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00813.x
- Hall J.L.** (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* **53**(366), 1–11.
- Hall J.L. and Williams L.E.** (2003). Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot* **54**(393), 2601–2613. doi:10.1093/jxb/erg303
- Hamier J. and Salin E.D.** (1998). Digestion efficiency study of an intraplasmic reactor for in-situ, halogen assisted direct solid sample digestion by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. *Spectrochim Acta B* **53**(4), 621–632. doi:10.1016/S0584-8547(97)00149-3
- Hammermueller J.D., Bray T.M. and Bettger W.J.** (1987). Effect of zinc and copper deficiency on microsomal NADPH-dependent active oxygen generation in rat lung and liver. *J Nutr* **117**(5), 894–901.

- Haney C.J., Grass G., Franke S. and Rensing C.** (2005). New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**(6), 215–226. doi:10.1007/s10295-005-0224-3
- Hanikenne M., Krämer U., Demoulin V. and Baurain D.** (2005). A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol* **137**(2), 428–446. doi:10.1104/pp.104.054189
- Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C. and Hodge S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6), 2122–2127.
- Hawes C., Saint-Jore C., Martin B. and Zheng H.Q.** (2001). ER confirmed as the location of mystery organelles in *Arabidopsis* plants expressing GFP. *Trends Plant Sci* **6**, 245–246. doi:10.1016/S1360-1385(01)01980-X
- Hawes C. and Satiat-Jeunemaitre B.** (2005). The plant Golgi apparatus—going with the flow. *Biochim Biophys Acta* **1744**(3), 466–480. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.06.006
- Heazlewood J.L., Tonti-Filippini J., Verboom R.E. and Millar A.H.** (2005). Combining Experimental and Predicted Datasets for Determination of the Subcellular Location of Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**(2), 598–609. doi:10.1104/pp.105.065532
- Heckmann P. and Träbert E.** (1989). *Introduction to Spectroscopy of Atoms*. North-Holland.
- Henriques R., Jasik J., Klein M., Martinoia E., Feller U., Schell J., Pais M.S. and Koncz C.** (2002). Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol Biol* **50**(4-5), 587–597. doi:10.1023/A:1019942200164
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. and Korenaga T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**(1), 297–300.
- 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**(3), 383–93. doi:10.1016/S0092-8674(00)80747-3
- Hirschi K.D., Korenkov V.D., Wilganowski N.L. and Wagner G.J.** (2000). Expression of arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol* **124**(1), 125–33.
- Hoagland D.R. and Arnon D.I.** (1938). The water-culture method for growing plants without soil. *Univ Calif Agri Exp Stn Cir* **347**, 1–32.
- Holland I.B., Cole S.P.C., Kuchler K. and Higgins C.F.** (2003). *ABC proteins - From bacteria to man*. Academic Press.
- Holleman A., Wiberg N., Büchner E. and Wieberg E.** (1995). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 101, Walter de Gruyter, 34 edition.

- Horng Y.C., Cobine P.A., Maxfield A.B., Carr H.S. and Winge D.R.** (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* **279**(34), 35334–35340. doi:10.1074/jbc.M404747200
- Huang L. and Gitschier J.** (1997). A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nat Genet* **17**(3), 292–297. doi:10.1038/ng1197-292
- Huang X.F. and Arvan P.** (1995). Intracellular Transport of Proinsulin in Pancreatic beta-Cells. *J Biol Chem* **270**(35), 20417–20423.
- 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**(5), 1327–1339. doi:10.1105/tpc.020487.
- Jacob C., Maret W. and Vallee B.L.** (1998). Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7), 3489–3494. doi:10.1073/pnas.95.7.3489
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. and Bevan M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**(13), 3901–3907.
- Jirakulaporn T. and Muslin A.J.** (2004). Cation diffusion facilitator proteins modulate Raf-1 activity. *J Biol Chem* **279**(26), 27807–27815. doi:10.1074/jbc.M401210200
- Johnsson N. and Varshavsky A.** (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10340–10344.
- Kamiya T., Akahori T., Ashikari M. and Maeshima M.** (2006). Expression of the vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger, OsCAX1a, in rice: cell and age specificity of expression, and enhancement by Ca²⁺. *Plant Cell Physiol* **47**(1), 96–106. doi:10.1093/pcp/pci227
- Kantor T.** (2001). Electrothermal vaporization and laser ablation sample introduction for flame and plasma spectrometric analysis of solid and solution samples. *Spectrochim Acta B* **56**(9), 1523–1563. doi:10.1016/S0584-8547(01)00266-X
- Kantor T. and de Loos-Vollebregt M.T.** (2005). Linearization of calibration curves by aerosol carrier effect of CCl₄ vapor in electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim Acta B* **60**(3), 333–343. doi:10.1016/j.sab.2005.02.022
- Karimi M., Inze D. and Depicker A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**(5), 193–195. doi:10.1016/S1360-1385(02)02251-3
- Katoh K., Misawa K., Kuma K.i. and Miyata T.** (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl Acids Res* **30**(14), 3059–3066. doi:10.1093/nar/gkf436
- Kim B.E., Wang F., Dufner-Beattie J., Andrews G.K., Eide D.J. and Petris M.J.** (2004). Zn²⁺-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane. *J Biol Chem* **279**(6), 4523–4530. doi:10.1074/jbc.M310799200

- Kim J.H., Johannes L., Goud B., Antony C., Lingwood C.A., Daneman R. and Grinstein S.** (1998). Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6), 2997–3002. doi:10.1073/pnas.95.6.2997
- Kispal G., Csere P., Prohl C. and Lill R.** (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* **18**(14), 3981–3989.
- Kobae Y., Uemura T., Sato M.H., Ohnishi M., Mimura T., Nakagawa T. and Maeshima M.** (2004). Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol* **45**(12), 1749–1758. doi:10.1093/pcp/pci015
- 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**(1), 37–44. doi:10.1023/A:1026438615520
- Krach C.** (2003). *Untersuchungen an AtCDF1;3, einem vakuolären Zinktransporter aus dem Hypokotyl Arabidopsis halleri*. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Krämer U.** (2005). MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cells. *Trends Plant Sci* **10**(7), 313–315. doi:10.1016/j.tplants.2005.05.008
- Krämer U. and Clemens S.** (2005). Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. *Top Curr Gen* **14**, in press.
- Kropat J., Tottey S., Birkenbihl R.P., Depege N., Huijser P. and Merchant S.** (2005). A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18730–18735. doi:10.1073/pnas.0507693102
- Kyte J. and Doolittle R.F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1), 105–132. doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0
- Lahner B., Gong J., Mahmoudian M., Smith E.L., Abid K.B., Rogers E.E., Guerinot M.L., Harper J.F., Ward J.M., McIntyre L., Schroeder J.I. and Salt D.E.** (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **21**(10), 1215–1221.
- Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C. and Morel F.M.** (2005). Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **435**(7038), 42. doi:10.1038/435042a
- Lanquar V., Lelièvre F., Bolte S., Hamès C., Alcon C., Neumann D., Vansuyt G., Curie C., Schröder A., Krämer U., Barbier-Brygoo H. and Thomine S.** (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J* **24**(23), 4041–4051. doi:10.1038/sj.emboj.7600864
- Lee M., Lee K., Lee J., Noh E.W. and Lee Y.** (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**(2), 827–836. doi:10.1104/pp.104.058107

- Li L. and Kaplan J.** (1998). Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J Biol Chem* **273**(35), 22181–22187.
- Li L. and Kaplan J.** (2001). The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* **276**(7), 5036–5043. doi:10.1074/jbc.M008969200
- Li L. and Kaplan J.** (2004). A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism. *J Biol Chem* **279**(32), 33653–33661. doi:10.1074/jbc.M403146200
- Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczyпка M., Thiele D.J. and Rea P.A.** (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1), 42–47. doi:10.1073/pnas.94.1.42
- Li Z.S., Szczyпка M., Lu Y.P., Thiele D.J. and Rea P.A.** (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S- conjugate pump. *J Biol Chem* **271**(11), 6509–6517.
- Lin S.J., Pufahl R.A., Dancis A., O'Halloran T.V. and Culotta V.C.** (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* *ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* **272**(14), 9215–9220.
- Linke K., Wolfram T., Bussemer J. and Jakob U.** (2003). The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *J Biol Chem* **278**(45), 44457–44466. doi:10.1074/jbc.M307491200
- MacDiarmid C.W., Gaither L.A. and Eide D.** (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**(12), 2845–2855. doi:10.1093/emboj/19.12.2845
- MacDiarmid C.W., Milanick M.A. and Eide D.J.** (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**(42), 39187–39194. doi:10.1074/jbc.M205052200
- MacDiarmid C.W., Milanick M.A. and Eide D.J.** (2003). Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J Biol Chem* **278**(17), 15065–15072. doi:10.1074/jbc.M300568200
- Mackenzie B. and Hediger M.A.** (2004). SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflugers Arch* **447**(5), 571–579.
- Mann K.J., Hepworth M.R., Raikwar N.S., Deeg M.A. and Sevlever D.** (2004). Effect of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-phospholipase D overexpression on GPI metabolism. *Biochem J* **378**(Pt 2), 641–648. doi:10.1042/BJ20031326
- Marmagne A., Rouet M.A., Ferro M., Rolland N., Alcon C., Joyard J., Garin J., Barbier-Brygoo H. and Ephritikhine G.** (2004). Identification of New Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* Plasma Membrane Proteome. *Mol Cell Proteomics* **3**(7), 675–691. doi:10.1074/mcp.M400001-MCP200
- Marschner H.** (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, volume 1. Academic Press Ltd., London, 2nd edition.

- Martinez I.M. and Chrispeels M.J.** (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* **15**(2), 561–576.
- Matousek J.P. and Powell H.K.J.** (1986). Halogen assisted volatilization in electrothermal atomic absorption spectroscopy: reduction of memory effects from refractory carbides. *Spectrochim Acta B* **41**(12), 1347–1355. doi:10.1016/0584-8547(86)80010-6
- Matsushima R., Kondo M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I.** (2003). A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J* **33**(3), 493–502. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x
- Miller J.D., Arteca R.N. and Pell E.J.** (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **120**(4), 1015–1024.
- Miller J.P., Lo R.S., Ben-Hur A., Desmarais C., Stagljar I., Noble W.S. and Fields S.** (2005). Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34), 12123–12128. doi:10.1073/pnas.0505482102
- Mills R.F., Francini A., Ferreira da Rocha P.S., Baccarini P.J., Aylett M., Krijger G.C. and Williams L.E.** (2005). The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Lett* **579**(3), 783–791. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.040
- 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**(2), 164–176. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01790.x
- Minet M., Dufour M.E. and Lacroute F.** (1992). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J* **2**(3), 417–422. doi:10.1046/j.1365-313X.1992.t01-38-00999.x
- Morandini P., Valera M., Albumi C., Bonza M.C., Giacometti S., Ravera G., Murgia I., Soave C. and De Michelis M.I.** (2002). A novel interaction partner for the C-terminus of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁺-ATPase (AHA1 isoform): site and mechanism of action on H⁺-ATPase activity differ from those of 14-3-3 proteins. *Plant J* **31**(4), 487–497. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01373.x
- Mosavi L.K., Minor D.L. and Peng Z.Y.** (2002). Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25), 16029–16034. doi:10.1073/pnas.252537899
- Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A. and Guerinot M.L.** (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**(4), 1646–1667.
- Murashige T. and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–497.

- Murray M.G. and Thompson W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**(19), 4321–4325.
- Nair R. and Rost B.** (2005). Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. *J Mol Biol* **348**(1), 85–100. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.025
- Nelson N.** (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* **18**(16), 4361–4371. doi:10.1093/emboj/18.16.4361
- Nühse T.S., Stensballe A., Jensen O.N. and Peck S.C.** (2003). Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **2**(11), 1234–1243. doi:10.1074/mcp.T300006-MCP200
- Obrdlik P., El-Bakkoury M., Hamacher T., Cappellaro C., Vilarino C., Fleischer C., Ellerbrok H., Kamuzinzi R., Ledent V., Blaudez D., Sanders D., Revuelta J.L., Boles E., Andre B. and Frommer W.B.** (2004). K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33), 12242–12247. doi:10.1073/pnas.0404467101
- O’Halloran T.V.** (1993). Transition metals in control of gene expression. *Science* **261**(5122), 715–725.
- Oparka K.J. and Roberts A.G.** (2001). Plasmodesmata. A Not So Open-and-Shut Case. *Plant Physiol* **125**(1), 123–126. doi:10.1104/pp.125.1.123
- Oteiza P.I., Clegg M.S., Zago M.P. and Keen C.L.** (2000). Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic Biol Med* **28**(7), 1091–1099. doi:10.1016/S0891-5849(00)00200-8
- Outten C.E. and O’Halloran T.V.** (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**(5526), 2488–2492. doi:10.1126/science.1060331
- Palmgren M.G.** (2001). PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 817–845. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.817
- Palmiter R.D. and Findley S.D.** (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* **14**(4), 639–649.
- Palmiter R.D. and Huang L.** (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* **447**(5), 744–751.
- Paroutis P., Touret N. and Grinstein S.** (2004). The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. *Physiology* **19**(4), 207–215. doi:10.1152/physiol.00005.2004
- Paulsen I.T. and Saier M. H. J.** (1997). A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **156**(2), 99–103.
- Peltier J.B., Ytterberg A.J., Sun Q. and van Wijk K.J.** (2004). New Functions of the Thylakoid Membrane Proteome of *Arabidopsis thaliana* Revealed by a Simple, Fast, and Versatile Fractionation Strategy. *J Biol Chem* **279**(47), 49367–49383. doi:10.1074/jbc.M406763200

- Pena M.M., Puig S. and Thiele D.J.** (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* **275**(43), 33244–33251. doi:10.1074/jbc.M005392200
- 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 U S A* **97**(9), 4956–4960.
- Persans M.W., Nieman K. and Salt D.E.** (2001). Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17), 9995–10000.
- Petris M.J., Smith K., Lee J. and Thiele D.J.** (2003). Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem* **278**(11), 9639–9646. doi:10.1074/jbc.M209455200
- Petris M.J., Voskoboinik I., Cater M., Smith K., Kim B.E., Llanos R.M., Strausak D., Camakaris J. and Mercer J.F.** (2002). Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate. *J Biol Chem* **277**(48), 46736–46742. doi:10.1074/jbc.M208864200
- Petrovic S., Pascolo L., Gallo R., Cupelli F., Ostrow J.D., Goffeau A., Tiribelli C. and Bruschi C.V.** (2000). The products of *YCF1* and *YLL015w* (*BPT1*) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**(6), 561–571. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<561::AID-YEA551>3.0.CO;2-L
- Petrukhin K., Lutsenko S., Chernov I., Ross B.M., Kaplan J.H. and Gilliam T.C.** (1994). Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet* **3**(9), 1647–1656.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T., Leitao M., Okamoto O.K., Morse D. and Colepicolo P.** (2003). Heavy metal induced oxidative stress in algae. *J Phycol* **39**, 1008–1018. doi:10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x
- Ponka P., Sheftel A.D. and Zhang A.S.** (2002). Iron targeting to mitochondria in erythroid cells. *Biochem Soc Trans* **30**(4), 735–738.
- Prell L.J., Styris D.L. and Redfield D.A.** (1991). Comparison of atomization mechanisms for group IIA elements in electrothermal atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* **6**, 25–32. doi:10.1039/JA9910600025
- 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**(5415), 805–808. doi:10.1126/science.284.5415.805
- Rea P.A., Sanchez-Fernandez R., Chen S., Peng M., Klein M., Geisler M. and Martinoia E.** (2003). The plant ABC transporter superfamily: the functions of a few and identities of many. In I.B. Holland, S.P.C. Cole, K. Kuchler and C.F. Higgins, editors, *ABC proteins - From bacteria to man*, pages 335–355, Academic Press.

- Rijstenbil J.W., Derksen J.W.M., Gerringa L.J.A., Poortvliet T.C.W., Sandee A., Berg M., Drie J. and Wijnholds J.A.** (1994). Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, grown in continuous cultures with high and low zinc levels. *Mar Biol* **119**(4), 583–590. doi:10.1007/BF00354321
- Rose M. and Botstein D.** (1983). Construction and use of gene fusions lacZ (β -galactosidase) which are expressed in yeast. *Meth Enzymol* **101**, 167–180.
- Rudrabhatla P., Reddy M.M. and Rajasekharan R.** (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/ threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant Mol Biol* **60**(2), 293–319. doi:10.1007/s11103-005-4109-7
- Sambrook J. and Russel D.** (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuel L., Nakagawa K. and Kimijima T.** (1996). Optimization of ETV-ICP-MS conditions for the determination of multi-elements in semiconductor grade acids. *Fresenius J Anal Chem* **356**(1), 31–36. doi:10.1007/s0021663560031
- Sancenon V., Puig S., Mateu-Andres I., Dorcey E., Thiele D.J. and Penarrubia L.** (2004). The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* **279**(15), 15348–15355. doi:10.1074/jbc.M313321200
- 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**(4), 577–587.
- Satiat-Jeunemaitre B. and Hawes C.** (2001). *Plant Cell Biology: A Practical Approach*, chapter Immunocytochemistry for light microscopy, pages 207–235. Oxford University Press.
- Schaaf G., Catoni E., Fitz M., Schwacke R., Schneider A., von Wiren N. and Frommer W.B.** (2002). A putative role for the vacuolar calcium/manganese proton antiporter AtCAX2 in heavy metal detoxification. *Plant Biol* **4**, 612–618. doi:10.1055/s-2002-35432
- Schaaf G., Ludewig U., Erenoglu B.E., Mori S., Kitahara T. and von Wiren N.** (2004). ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem* **279**(10), 9091–9096. doi:10.1074/jbc.M311799200
- Schaaf G., Schikora A., Häberle J., Vert G., Ludewig U., Briat J.F., Curie C. and von Wirén N.** (2005). A putative function for the arabidopsis Fe-Phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol* **46**(5), 762–774. doi:10.1093/pcp/pci081
- Scheres B., Benfey P. and Dolan L.** (2002). Root Development. *The Arabidopsis Book* **40**(1), 1–18. doi:10.1199/tab.0101
- Schimmöller F., Díaz E., Mühlbauer B. and Pfeffer S.R.** (1998). Characterization of a 76 kDa endosomal, multispinning membrane protein that is highly conserved throughout evolution. *Gene* **216**(2), 311–318. doi:10.1016/S0378-1119(98)00349-7

- Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Schölkopf B., Weigel D. and Lohmann J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**(5), 501–506. doi:10.1038/ng1543
- Schräger H. and Jagow G.v.** (1991). Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Anal Biochem* **199**, 223–231.
- Schütz E. and von Ahsen N.** (1999). Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques* **27**, 1218–1224.
- Schwacke R., Schneider A., van der Graaff E., Fischer K., Catoni E., Desimone M., Frommer W.B., Flügge U.I. and Kunze R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* **131**(1), 16–26. doi:10.1104/pp.011577
- Seigneurin-Berny D., Gravot A., Auroy P., Mazard C., Kraut A., Finazzi G., Grunwald D., Rappaport F., Vavasseur A., Joyard J., Richaud P. and Rolland N.** (2006). HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem* **281**(5), 2882–2892. doi:10.1074/jbc.M508333200
- Shaul O., Hilgemann D.W., de Almeida-Engler J., Van Montagu M., Inz D. and Galili G.** (1999). Cloning and characterization of a novel Mg(2+)/H(+) exchanger. *EMBO J* **18**(14), 3973–3980.
- Shikanai T., Muller-Moule P., Munekage Y., Niyogi K.K. and Pilon M.** (2003). PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**(6), 1333–1346.
- Sikorski R.S. and Hieter P.** (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- Silva-Filho M.C.** (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol* **6**(6), 589–595. doi:10.1016/j.pbi.2003.09.008
- Snaith S.M. and Levy G.A.** (1968). Alpha-mannosidase as a zinc-dependent enzyme. *Nature* **218**(136), 91–92. doi:10.1038/218091a0
- Sánchez-Fernández R., Davies T.G., Coleman J.O. and Rea P.A.** (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* **276**(32), 30231–30244. doi:10.1074/jbc.M103104200
- Steinhauser D., Usadel B., Luedemann A., Thimm O. and Kopka J.** (2004). CSB.DB: a comprehensive systems-biology database. *Bioinformatics* **20**(18), 3647–3651. doi:10.1093/bioinformatics/bth398
- Stephan U.W. and Scholz G.** (1993). Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol Plant* **88**(3), 522–529.
- Stewart C., Bailey J. and Manoil C.** (1998). Mutant membrane protein toxicity. *J Biol Chem* **273**(43), 28078–28084.

- Stoeckelhuber M., Noegel A.A., Eckerskorn C., Kohler J., Rieger D. and Schleicher M.** (1996). Structure/function studies on the pH-dependent actin-binding protein hisactophilin in *Dictyostelium* mutants. *J Cell Sci* **109** (Pt 7), 1825–1835.
- Stohs S.J. and Bagchi D.** (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **18**(2), 321–336. doi:10.1016/0891-5849(94)00159-H
- Stone J.M., Liang X., Nekl E.R. and Stiers J.J.** (2005). *Arabidopsis* AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J* **41**(5), 744–754. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02334.x
- Suzuki T., Ishihara K., Migaki H., Ishihara K., Nagao M., Yamaguchi-Iwai Y. and Kambe T.** (2005a). Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. *J Biol Chem* **280**(35), 30956–30962. doi:10.1074/jbc.M506902200
- Suzuki T., Ishihara K., Migaki H., Matsuura W., Kohda A., Okumura K., Nagao M., Yamaguchi-Iwai Y. and Kambe T.** (2005b). Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **280**(1), 637–643. doi:10.1074/jbc.M411247200
- Szczyпка M.S., Wemmie J.A., Moye-Rowley W.S. and Thiele D.J.** (1994). A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multi-drug resistance- associated protein. *J Biol Chem* **269**(36), 22853–22857.
- Sze H., Schumacher K., Müller M.L., Padmanaban S. and Taiz L.** (2002). A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H(+)-ATPase. *Trends Plant Sci* **7**(4), 157–161. doi:10.1016/S1360-1385(02)02240-9
- Taiz L. and Zeiger E.** (2002a). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, 3 edition.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2002b). *Plant Physiology*, chapter Mineral Nutrition, pages 67–86. Sinauer Associates, 3 edition.
- Tate Jr. D.J., Miceli M.V. and Newsome D.A.** (1999). Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **26**(5-6), 704–713. doi:10.1016/S0891-5849(98)00253-6
- Taunton J.** (2001). Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr Opin Cell Biol* **13**(1), 85–91. doi:10.1016/S0955-0674(00)00178-2
- Teasdale R.D. and Jackson M.R.** (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 27–54. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.27
- Tian G.W., Mohanty A., Chary S.N., Li S., Paap B., Drakakaki G., Kopec C.D., Li J., Ehrhardt D., Jackson D., Rhee S.Y., Raikhel N.V. and Citovsky V.** (2004). High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Plant Physiol* **135**(1), 25–38. doi:10.1104/pp.104.040139

- Tommasini R., Vogt E., Fromenteau M., Hortensteiner S., Matile P., Amrhein N. and Martinoia E.** (1998). An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione- conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* **13**(6), 773–780. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00076.x
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 4350–4354.
- Uemura T., Ueda T., Ohniwa R.L., Nakano A., Takeyasu K. and Sato M.H.** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* **29**(2), 49–65. doi:10.1247/csf.29.49
- Uemura T., Yoshimura S.H., Takeyasu K. and Sato M.H.** (2002). Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells* **7**(7), 743–753. doi:10.1046/j.1365-2443.2002.00550.x
- Unte U.S., Sorensen A.M., Pesaresi P., Gandikota M., Leister D., Saedler H. and Huijser P.** (2003). SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**(4), 1009–1019. doi:10.1105/tpc.010678
- Valentine J.S. and Gralla E.B.** (1997). Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* **278**(5339), 817–818. doi:10.1126/science.278.5339.817
- van den Elsen J.M., Kuntz D.A. and Rose D.R.** (2001). Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *EMBO J* **20**(12), 3008–3017. doi:10.1093/emboj/20.12.3008
- 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**(3), 1047–1055.
- Verret F., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., David P., Nussaume L., Vavasseur A. and Richaud P.** (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* **576**(3), 306–312. doi:10.1016/j.febslet.2004.09.023
- Verret F., Gravot A., Auroy P., Preveral S., Forestier C., Vavasseur A. and Richaud P.** (2005). Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch. *FEBS Lett* **579**(6), 1515–1522. doi:10.1016/j.febslet.2005.01.065
- Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp 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**(6), 1223–1233. doi:10.1105/tpc.001388
- Viotti C., Luoni L., Morandini P. and Michelis M.I.D.** (2005). Characterization of the interaction between the plasma membrane H-ATPase of *Arabidopsis thaliana* and a novel interactor (PPI1). *FEBS J* **272**(22), 5864–5871. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04985.x

- Walter M., Chaban C., Schutze K., Batistic O., Weckermann K., Nake C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K. and Kudla J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**(3), 428–438. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x
- Wang F., Dufner-Beattie J., Kim B.E., Petris M.J., Andrews G. and Eide D.J.** (2004). Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters. *J Biol Chem* **279**(23), 24631–24639. doi:10.1074/jbc.M400680200
- Weber M., Harada E., Vess C., v 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**(2), 269–281. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01960.x
- Wei Y. and Fu D.** (2006). Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the *Escherichia coli* metal transporter YiiP. *J Biol Chem* **281**(33), 23492–23502. doi:10.1074/jbc.M602254200
- Welz B., Curtius A.J., Schlemmer G., Ortner H.M. and Birzer W.** (1986). Scanning electron microscopy studies on surfaces from electrothermal atomic absorption spectrometry–III. The lanthanum modifier and the determination of phosphorus. *Spectrochim Acta B* **41**(11), 1175–1201. doi:10.1016/0584-8547(86)80177-X
- Wilden W.V.D. and Chrispeels M.J.** (1983). Characterization of the Isozymes of α -Mannosidase Located in the Cell Wall, Protein Bodies, and Endoplasmic Reticulum of *Phaseolus vulgaris* Cotyledons. *Plant Physiol* **71**(1), 82–87.
- Williams L.E. and Mills R.F.** (2005). P(1B)-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* **10**(10), 491–502. doi:10.1016/j.tplants.2005.08.008
- Williams L.E., Pittman J.K. and Hall J.L.** (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta* **1465**(1-2), 104–126.
- Wintz H. and Vulpe C.** (2002). Plant copper chaperones. *Biochem Soc Trans* **30**(4), 732–735.
- Wittke S., Lewke N., Muller S. and Johnsson N.** (1999). Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol Biol Cell* **10**(8), 2519–2530.
- 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**(3), 443–455.
- Woolhouse H.W.** (1983). Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler, editors, *Encyclopedia of Plant Physiology: Responses to the Chemical and Biological Environment*, volume New Series vol. 12 C, pages 245–300, Springer Verlag, Berlin.

- Wu H., Li L., Du J., Yuan Y., Cheng X. and Ling H.Q.** (2005). Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**(9), 1505–1514. doi:10.1093/pcp/pci163
- Xu H., Knox R.B., Taylor P.E. and Singh M.B.** (1995). Bcp1, a gene required for male fertility in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6), 2106–2110.
- Yamamoto Y., Nishimura M., Hara-Nishimura I. and Noguchi T.** (2003). Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **44**(11), 1192–1201.
- Yamasaki, Kigawa, Inoue, Yamasaki, Yabuki, Aoki, Seki, Matsuda, Tomo, Terada, Shirouzu, Tanaka, Seki, Shinozaki and Yokoyama** (2006). An *Arabidopsis* SBP-domain fragment with a disrupted C-terminal zinc-binding site retains its tertiary structure. *FEBS Lett* **580**(8), 2109–2116. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.014
- Zenk M.H.** (1996). Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene* **179**(1), 21–30.
- Zha H.G., Jiang R.F., Zhao F.J., Vooijs R., Schat H., Barker J.H.A. and McGrath S.P.** (2004). Co-segregation analysis of cadmium and zinc accumulation in *Thlaspi caerulescens* interecotypic crosses. *New Phytol* **163**(2), 299–312. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01113.x
- Zhang B., Georgiev O., Hagemann M., Gunes C., Cramer M., Faller P., Vasak M. and Schaffner W.** (2003). Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol* **23**(23), 8471–8485. doi:10.1128/MCB.23.23.8471-8485.2003
- Zheng H., Bednarek S.Y., Sanderfoot A.A., Alonso J., Ecker J.R. and Raikhel N.V.** (2002). NPSN11 is a cell plate-associated SNARE protein that interacts with the syntaxin KNOLLE. *Plant Physiol* **129**(2), 530–539. doi:10.1104/pp.003970
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L. and Gruissem W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621–2632. doi:10.1104/pp.104.046367

A Anhang

A.1 Sequenzen von *AtMTP2* und *AtMTP12*, Primerbindungsstellen

In den beiden folgenden Untersektionen werden zunächst die im Zuge der Charakterisierung von *AtMTP2* und *AtMTP12* eingesetzten Primer namentlich genannt und eine Referenz auf das(die) zugehörige(n) Experiment(e) gegeben. Zusätzliche Informationen sind in den referenzierten Abbildungen/Tabellen oder Abschnitten zu finden. Darauf folgt jeweils eine tabellarische Auflistung der Primer. Aufgelistet ist die Sequenz der Primer, die Richtung bezüglich der kodierenden Sequenz (*Sense, forward*: →; *Anti-Sense, reverse*: ←) sowie die Temperatur, bei der 50 % der Primermenge an der Matrize gebunden sind (T_m , mit MELTCALC Schütz und von Ahsen, 1999 berechnet). Die Primer-Bindungsstellen sind farblich in der auf diese Auflistung folgenden Sequenz von *AtMTP2* bzw. *AtMTP12* markiert.

A.1.1 *AtMTP2* (At3g61940): ORF, Primer, Aminosäuresequenz

Klonierung von *AtMTP2* in pENTR/D mit(ohne) Stop-Codon: ZAT2tpA/ZAT2tpZ(ZAT2tpX) (Abschnitt 2.1.10);¹ Test auf Homozygotie von *mtp2-S3* (Abb. 4.15): LBa1/ZAT2tpX und rtZAT2F/ZAT2tpX; Charakterisierung der T-DNA-Insertion von *mtp2-S3*: in Abschnitt 4.2.5 aufgelistete Kombinationen zwischen RBa1, RBb1, LBa1, LBb1, ZAT2tpA und ZAT2tpX; Test auf Heterozygotie der *mtp2-S3* × Col-0 Rückkreuzung (Abb. 4.26): LBb1/ZAT2tpX und ZAT2tpA/ZAT2tpX; Charakterisierung von *p35S::AtMTP2*-Linien (Abb. 4.27): EF1ar/EF1ar und AtCDF2sfa/ZAT2tpX.

Primer die nicht an der *AtMTP2*-Sequenz binden, wie die für EF1 α oder die T-DNA-Primer, wurden in der Auflistung abgesetzt.

Bezeichnung	Richtung	Sequenz	T_m
ZAT2tpA	→	5'-ATGGATTCAAGAAGAAGTAAAGTTTG-3'	61,1 °C
ZAT2tpX	←	5'-ACGCTCGATTTGTATCGTAACGTGA-3'	67,5 °C
ZAT2tpZ	←	5'-TTAACGCTCGATTTGTATCGTAACGTGA-3'	67,8 °C
rtZAT2F	→	5'-TTTGCTCACTGATGTTGGTGC-3'	64,4 °C
Atcdf2sfa	→	5'-AGGGACAACCATTAAGATGC-3'	60,2 °C
LBa1	-	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'	69,6 °C
LBb1	-	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'	73,5 °C
RBa1	-	5'-CTGAGTGGCTCCTTCAACG-3'	62,9 °C
RBb1	-	5'-ATTTATGGAACGTCAGTGGAGC-3'	63,5 °C
EF1af	→	5'-TAAGGATGGTCAGACCCGTGA-3'	65,2 °C
EF1ar	←	5'-AGACTCGTGGTGCATCTCAAC-3'	65,1 °C

¹ohne Stop-Codon: in dieser Arbeit, mit Stop-Codon: A.-G. Desbrosses-Fonrouge

```

5       10      15      20      25      30      35      40      45      50      55      60
ATGGATTCAAGAAGAAGTAAAGTTTGTGGAGAAACAGCTTGTGGGTTTTCAACATCTTCA
M D S R R S K V C G E T A C G F S T S S
65      70      75      80      85      90      95      100     105     110     115     120
AGTGATGCTAAGAAACGAGCTGCTTCAATGCGAAAGCTCTGTTTCGTTGGTGTATGT
S D A K K R A A S M R K L C F V V V L C
125     130     135     140     145     150     155     160     165     170     175     180
CTTTTGTTCATGAGCATAGAAGTTGTTTGTGGCATTAAAGGCTAACAGTTTGGCTATATTA
L L F M S I E V V C G I K A N S L A I L
185     190     195     200     205     210     215     220     225     230     235     240
GCAGATGCAGCTCATTTGCTCAGTGTGGTGCTTTTGCTATCTCTATGCTCTCCTTG
A D A A H L L T D V G A F A I S M L S L
245     250     255     260     265     270     275     280     285     290     295     300
TGGGCTTCTTCTTGGGAAGCAAATCCGCGACAGAGTTATGGGTTCTTCAGGATAGAGATT
W A S S W E A N P R Q S Y G F F R I E I
305     310     315     320     325     330     335     340     345     350     355     360
TTAGGCACTCTTGTCTCAATCCAGCTCATTTGGTTACTCACTGGGATTTGGTCTACGAA
L G T L V S I Q L I W L L T G I L V Y E
365     370     375     380     385     390     395     400     405     410     415     420
GCCGTAAGTACTCGTTCAAGAGACCAATGATGATGTTGATGGTTTCTTTATGGTTCTT
A V T R L V Q E T N D D V D G F F M V L
425     430     435     440     445     450     455     460     465     470     475     480
GTTGCTGCTTTTGGTTTAGTTGTAACATCATAATGATTGTTGTGCTTGGACATGATCAC
V A A F G L V V N I I M I V V L G H D H
485     490     495     500     505     510     515     520     525     530     535     540
GGACATGGGCATGATCATGGTCACAGTCATGATCATGGTCATAGTTATGGGGAAAGAGCT
G H G H D H G H S H D H G H S Y G E R A
545     550     555     560     565     570     575     580     585     590     595     600
GAGCAGTTGTTGGAGAAATCCAAGGAAATAAGGAAACATTAATGTGCAAGGGGCTTATCTT
E Q L L E K S K E I R N I N V Q G A Y L
605     610     615     620     625     630     635     640     645     650     655     660
CATGTTCTTGGGGATTTAATTCAGAGCATTGGGGTAATGATTGGAGGGGGTATGATTTGG
H V L G D L I Q S I G V M I G G G M I W
665     670     675     680     685     690     695     700     705     710     715     720
TATAACCCTAAATGGAAAGTAATTGACTTGATATGCACGTTATTCTTTTCAGTTATTGTT
Y N P K W K V I D L I C T L F F S V I V
725     730     735     740     745     750     755     760     765     770     775     780
TTAGGGCAACCATTAAGATGCTTTGAAGCATACTTGAAGTTCTAATGGAGAGCACACCG
L G T T I K M L R S I L E V L M E S T P
785     790     795     800     805     810     815     820     825     830     835     840
AGAGAGATAGACGCGAGGCAGCTCGAAAAGGGATTGATGGAAATGAGGAAGTTGTGGAT
R E I D A R Q L E K G L M E I E E V V D
845     850     855     860     865     870     875     880     885     890     895     900
GTTTCATGAGCTGCACATATGGGCAATTACAGTTGGAAAAGCTCTGTTTTCTTGTTCATGTC
V H E L H I W A I T V G K A L F S C H V
905     910     915     920     925     930     935     940     945     950     955     960
AAGGTTAGACCAGAAGCTGGTGATGAAATGGTGCTGAACAAAGTGATCGATTACATCTGG
K V R P E A G D E M V L N K V I D Y I W
965     970     975     980     985     990     995     1000    1005
AGAGAGTATCGTATCAGTCACGTTACGATACAAATCGAGCGTTAA
R E Y R I S H V T I Q I E R .

```

A.1.2 *AtMTP12* (At2g04620): ORF, Primer, Aminosäuresequenz

Klonierung durch homologe Rekombination in Hefe (Abschnitt 2.1.12): GWHR-AtCDF5f/GWHR-AtCDF5r; genspezifische Primer für 5'-RACE (Abschnitt 2.1.6): AtCDF5-5Ra, AtCDF5-5Rb (*nested*); Sequenzierungsprimer: AtCDF5fa, rtZAT5r (neben Vektorprimern sowie AtCDF5-5Ra und AtCDF5-5Rb).

Der Primer GWHR-ATCDF5f enthält sechs Codons *upstream* des translationalen Start-ATG, die in der *AtMTP12*-Sequenz nicht aufgelistet sind. Mit anderen Primern, die *downstream* der hellgrau markierten Bindungsstelle binden, konnte *AtMTP12* nicht amplifiziert werden. Für die Primer, die für die

A ANHANG

605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660
 TCGTTTTGTTTGTGGGTTGTTGTTGTTATCAATCAGCTGGGATCGTGTTGATTGTTTC
 C V L F A G L L L S I S W D R V D C F
 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720
 CCGTTTTCATCTGTGTTGAAAGTTGGGTTTTTGGATTACCCATAAGAGAATTGCTTG
 P F S S S V E S W G F W I Y P K E N C L
 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780
 AGGATTTGGCCTCTGTTGCTTCCGTTTTCTATCTGGTTTTCTTAGGTTGTTATGAGAAAGTT
 R I W P L L P F L S G F L G C Y E K V
 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840
 TCTGTGAATTGGAATGAGATCAAACAGTTAGATCAGAAACGAGTTCGATTACTGTCTTTG
 S V N W N E I K Q L D Q K R V R L L S L
 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900
 TTTCTAACCACTGTGTTGTTGTTCCCACTTGCTATTTGGAGTTTTCTTCTTCTGCTAGT
 F L T T V L L F P L A I W S F F S G S
 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960
 GGTGATGATAGTGTCTTTTTGGGAATTTAGGTTGGCCTTTAGCTAACACTGTTGTATTT
 G D D S V S F G N L G W P L A N T V V F
 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020
 GGAGTGTGTTGAGTGAGAATTATAATGATGATAAGTTTTCAAGCTCGAAGAAGAAGGAC
 G V L L S E N Y N D D K F S S S K K K D
 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080
 TCAGAGGGGAGTTTCTTGTAAACGTTTCTATGTACTATAGTATTGGAACCTTCTATTTT
 S E R E F L V T F L C T I V L E L F Y F
 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140
 CCTGAGCTATCTCTTTGGGGATTGTTGCTTTGTGTTTTGTTGCTTTACATTGCTGTTAGA
 P E L S L W G L L C G L L L Y I A V R
 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 GAGTTGGAGTCTGTGTATTTCAGATTATCAAGAGATTGGTATGGAATCGCCTGAGTCGTTT
 E L E S V Y S D Y Q E I G M E S P E S F
 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260
 TCCACTATGTTTATGAAGCCTATCCGTCACATTTTGGAGCGAGAAGAAATCGAGGAAGATT
 S T M F M K P I R H I L S E K K S R K I
 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320
 GCGTTGTTTCTTTTGATTAATACGGCGTATATGGTGGTTGAGTTTGTGGCTGGTTTTATG
 A L F L L I N T A Y M V V E F V A G F M
 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380
 AGTAACAGTCTTGGATTGATCTCAGACGCTTGTATATGTTGTTTGAATTGTGCTGCTTTG
 S N S L G L I S D A C H M L F D C A A L
 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 GCAATTGGGCTGTATGCGTCTTATATCTCTCGTCTTCTGCAAACCATCAGTATAACTAT
 A I G L Y A S Y I S R L P A N H Q Y N Y
 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500
 GGCCGAGTAGATTTGAAGTGTCTTCTGTTATGTTAACGCGGTGTTCTTTGTTTCTTGT
 G R G R F E V L S G Y V N A V F L V L V
 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560
 GGGGCTCTGATTGTGCTTGGAGTCGATTGAGAGAATCTTGGATCCTCAGGAGATTTCTACA
 G A L I V L E S I E R I L D P Q E I S T
 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620
 AATAGTCTTTTGGTTGTTTCCGTTGGTGGGCTTCTCGTGAATATCGTGGGTTAATCTTT
 N S L L V V S V G G L L V N I V G L I F
 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
 TTCCACGAGGAACATCATCATGCTCATGGTGGATCTGGTTGCACACATTCTCACTCACAC
 F H E E H H A H G G S G C T H S H S H
 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740
 CAATCCATAGCCATAAAAATGAGGAGCATCATCAGCATTAGATAGCCATAAACATGAG
 Q S H S H K N E E H H Q H S D S H K H E
 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800
 GAACATCATCAGCATTAGATAGCCATAAACATGAGGAACATCATGAGCATGACCATCAT
 E H H Q H S D S H K H E E H H E H D H H
 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860
 CATCATTTCCATAGCCATAAACACGAGGAGTGCAACCACAACCACGACCATGAGCATCAA
 H H S H S H K H E E C N H N H D H E H Q
 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920
 TCCATAGCCATAATCACGAGGAGTGCAACCACAACCACGACCATCATTCTGATCACCAA
 S H S H N H E E C N H N H D H H S D H Q

D

A.1 SEQUENZEN VON *AtMTP2* UND *AtMTP12*, PRIMERBINDUNGSSTELLEN

1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980
 CCTGAAAAAAGCGAAAAGAAGGAGCATCGCCACATTGATCACAATATGGAAGGAATCTTT
 P E K S E K K E H R H I D H N M E G I F
 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040
 CTTCA TGTTT TAGCAGACACAATGGGGAGTGTGGAGTTGTGATATCGACACTCTTGATT
 L H V L A D T M G S V G V V I S T L L I
 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100
 AAATACAAGGGCTGGTTAGTTGCAGATCCAGCCAGCTCAATCTTTATCTCCATCCTCATC
 K Y K G W L V A D P A S S I F I S I L I
 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160
 ATCGCTTCAGTCATTCCGTTGCTACGAAACTCTGCGGAGATTCTACTGCAAAGAGTCCCT
 I A S V I P L L R N S A E I L L Q R V P
 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220
 AGGGCTCACAGGCAAGACCTGAAAGAAGCTATGAGGAACATACTTAAGACTAAAGGTGT
 R A H R Q D L K E A M R N I L K T K G V
 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280
 TGCAGTATCCAGAGGCTGCATGTATGGAGTTTACCAACTCAGACGTCGTGGCTACTCTC
 C S I Q R L H V W S F T N S D V V A T L
 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340
 CATCTCCTTGATCTGCAGATTTCAGACAAGACGGATACTAAGTTACAAGTGCACGTTTGT
 H L L V S A D S D K T D T K L Q V S R L
 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395
 TTAGAAGATGCAGGAGTAAAGGATTGGAATTGCGAGGTGGAATCTGTTAACTCATAG
 L E D A G V K D W T L Q V E S V N S

A.1.3 Primer für die Klonierung der Interaktionskandidaten

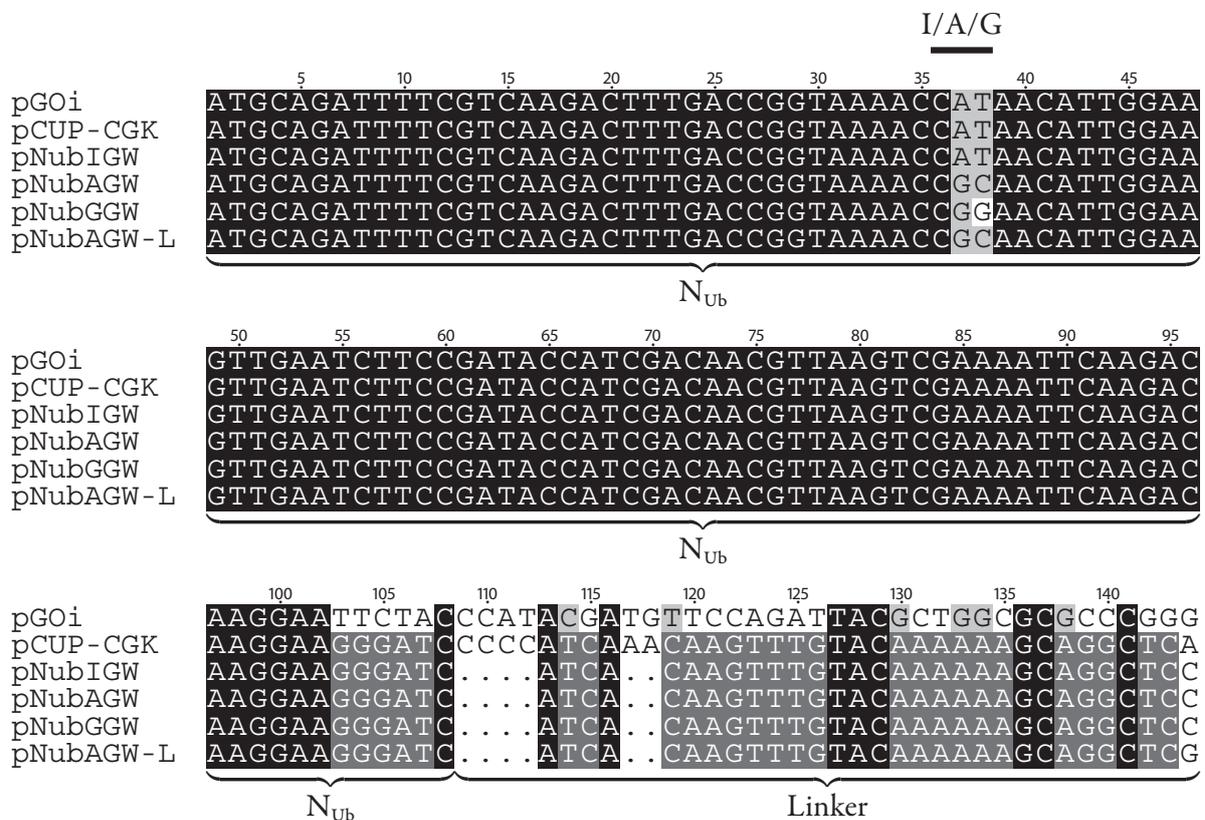
Für die Klonierung der Kandidaten in den Gateway®-Vektor pENTR/D wurden die im Folgenden aufgelisteten Primer verwendet. Zusätzliche Sequenzierungsprimer wurden abgesetzt.

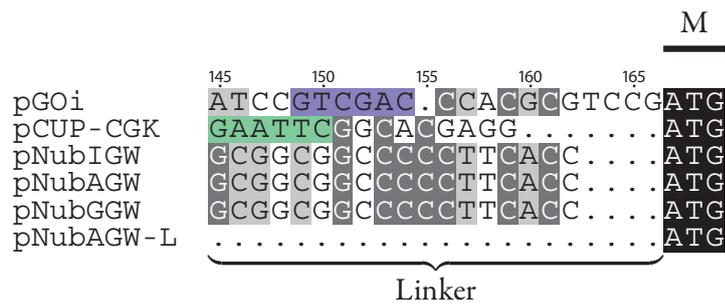
Bezeichnung	Richtung	Sequenz	T _m
At1g24520f	→	5'-CACCATGGGTCGCCAAAACATTG-3'	61,6 °C/68 °C)
At1g24520rZ	←	5'-TCATAAAACAATGCCCAACTTAG-3'	60,2 °C
At1g50020f	→	5'-CACCATGGCTTCTTCTTCTCTGGAG-3'	61,9 °C/67,9 °C)
At1g50020rZ	←	5'-CTAATTTAGACGAGGATCCATCC-3'	60,8 °C
At2g32580f	→	5'-CACCATGGCGAAGCACACGG-3'	62,3 °C/69,3 °C)
At2g32580rZ	←	5'-TTAAGCAACCTCAGTGCCG-3'	62,9 °C
At2g32720f	→	5'-CACCATGGGAGACGAAGCAAAGATC-3'	62,9 °C/68,6 °C)
At2g32720rZ	←	5'-CTACCCTGATTTGGTGTAGATAC-3'	60,8 °C
At3g17440f	→	5'-CACCATGGCTTCTAATCTCCCATG-3'	62,1 °C/68 °C)
At3g17440rZ	←	5'-TCACATGTAGTCTTGATTCCTC-3'	60,1 °C
At3g17930f	→	5'-CACCATGGCTTCTTTACCGTTTCG-3'	60,4 °C/66,9 °C)
At3g17930rZ	←	5'-CTACTCAACCTTGGTCTTCTC-3'	60,1 °C
At3g45600f	→	5'-CACCATGAGAACAAGCAACCATCTC-3'	61 °C/67 °C)
At3g45600rZ	←	5'-TCAAAGATGAAATGACTAGGATG-3'	61,3 °C
At4g27500f	→	5'-CACCATGGGTGTTGAAGTTGTAAACTC-3'	62 °C/67,4 °C)
At4g27500rZ	←	5'-CTAGAGAACGTAGTAGTAACCCAAG-3'	62,7 °C
At4g27840f	→	5'-CACCATGACTTCGAATCAACGTATGTTG-3'	62,5 °C/67,6 °C)
At4g27840rZ	←	5'-TTACCCATCGATGCATTGAAAC-3'	62,1 °C
At4g32530f	→	5'-CACCATGTCTGGTGTGTTGCTC-3'	62,5 °C/68,8 °C)
At4g32530rZ	←	5'-CTATTCGTTGGCCATGTCG-3'	61,9 °C
At5g37310f	→	5'-CACCATGGTACTTCTTCCCTTCGATGAC-3'	62,7 °C/68,1 °C)

Bezeichnung	Richtung	Sequenz	T _m
At5g37310rZ	←	5'-TCAAGTTTTACTCGCACTTGATTG-3'	62,9 °C
At5g54940f	→	5'-CACCATGGTTGAGCTAGACATTCAG-3'	60,2 °C/66,4 °C
At5g54940rZ	←	5'-TTAGAAACCGTGGATCTTGATC-3'	60,7 °C
At5g37310sra	←	5'-GAAGTCTGCATGAACCCTGAC-3'	63,7 °C
At5g37310sfa	→	5'-GTTTCCTTGCACGATTCTC-3'	61,8 °C
At4g27500sra	→	5'-TGGTTTAGGTGCAGAACTGG-3'	63,2 °C

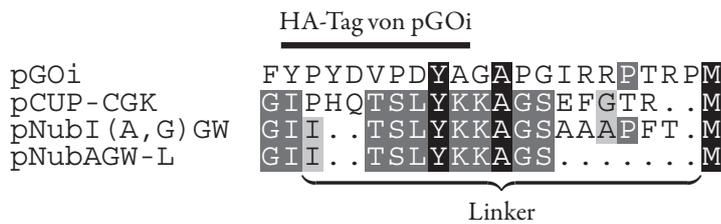
A.2 N_{Ub}-Vektoren: *Linker*-Sequenzen zwischen N_{Ub} und cDNA

Im Folgenden sind Ausschnitte aus den DNA-Sequenzen der im SUS eingesetzten N_{Ub}-Vektoren dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung der cDNAs bei der Konstruktion der Bibliotheken eingesetzt wurden, sind farbig markiert: *EcoRI* (G|AATTC), *SalI* (G|TCGAC). Die Sequenzen wurden durch Sequenzierung von mindestens drei Klonen erhalten bzw. im Fall der Vektoren pGOi und pCUP-CGK auf Grundlage von jeweils mehr als zehn Kandidaten. Der Vektor pGOi kodiert nur die Aminosäuren 1–34 von *UBI4*; alle anderen Vektoren kodieren die Aminosäuren 1–36.





Aminosäuresequenz der *Linker* zwischen N_{UB} und cDNA:



Die Sequenz der *Linker* der Vektoren pNubI(A,G)GW und pNubAGW-L ist abhängig vom Gateway®-*Entry*-Vektor, der in der LR-Reaktion eingesetzt wurde: bei der Verwendung von pDONR201 ergibt sich der bei pNubAGW-L dargestellte *Linker* und bei der Verwendung von pENTR/D der bei pNubI(A,G)GW dargestellte *Linker*. Dies entspricht der tatsächlichen Konfiguration aller in dieser Arbeit erwähnten pNubI(A,G)GW und pNubAGW-L Konstrukte.

A.3 CDFs von Hefe, Mensch und *Arabidopsis*: Phylogenetischer Baum

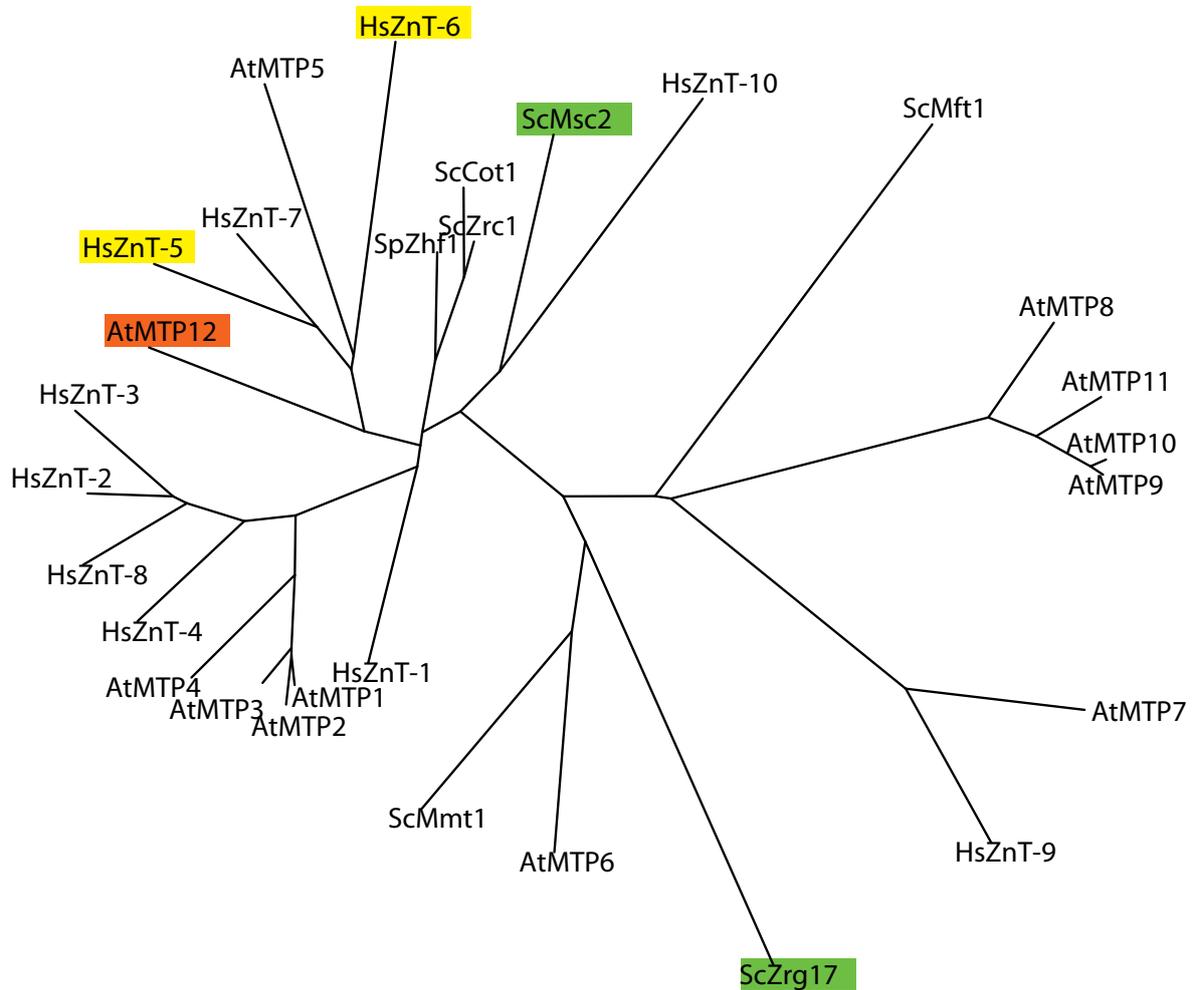


Abb. A.1: Phylogenetischer Baum von Hefe, Mensch und *Arabidopsis*. Die zugrundeliegenden Proteinsequenzen der CDFs wurden durch MAFFT v5.8 (Kato *et al.*, 2002) mit Standardeinstellungen aligniert. Der phylogenetische Baum wurde daraufhin basierend auf einem *Maximum Likelihood*-Ansatz mit dem Programm SEMPHY v1.05 berechnet (Friedman *et al.*, 2002). Diese Methode hat den Vorteil, gleichzeitig den evolutionären Abstand der CDFs und die Topologie des Baumes zu ermitteln. Die jeweils zwei Mitglieder der CDF-Familien von *H. sapiens* und *S. cerevisiae*, für welche die Bildung eines heteromeren Komplexes gezeigt wurde (Ellis *et al.*, 2004, 2005; Suzuki *et al.*, 2005a,b), wurden gelb bzw. grün markiert. AtMTP12 ist wahrscheinlich das zu HsZnT-5 und ScMsc2 orthologe Protein in *Arabidopsis* (siehe ABSCHNITT 6.2 und 6.3). Ein Interaktionspartner wurde für dieses Protein bisher nicht identifiziert. Auch der phylogenetische Baum liefert keine diesbezüglichen Hinweise.

B Lebenslauf

Persönliche Daten

Toralf Senger
Grundelbachstr. 112b
69469 Weinheim

Tel.: +49(0)6201 265958
E-Mail: toralf.senger@gmx.de

Geb. am 26. 06. 1976 in Halle/S.
Ledig, deutsch

Schulbildung

08/1983–06/1991 Polytechnische Oberschule *Albrecht Dürer* Halle
08/1991–06/1995 *Thomas-Müntzer-Gymnasium* Halle (Leistungskurse Biologie und Physik), Abitur »Sehr gut« (1.4)

Zivil/Wehrdienst

07/1995–09/1996 Zivildienst im Seniorenheim *Hospital St. Cyriaci et Antoni*

Studium

10/1996–09/1998 *Martin-Luther-Universität* Halle-Wittenberg, Studiengang Biochemie
09/1998 Vordiplom »Gut« (2.0)
02/1999 Leistungspraktikum am *MPI für Proteinchemie* Halle
1999 Studentische Hilfskraft am *Institut für Pflanzenbiochemie (IPB)* Halle
09/1999–07/2000 Studienaufenthalt an der *University of Wales* (Swansea, UK), Studiengang Biochemie
2000 Verleihung des Grades BACHELOR OF SCIENCE (»Upper Second Class«)
2000 Studentische Hilfskraft am *Institut für Biotechnologie* Halle
10/2000–06/2002 Beendigung des Studiums in Halle, Diplomarbeit am *Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)* Gatersleben, Diplom »Sehr gut« (1.4)

06/2002–04/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am *IPK* Gatersleben

06/2003–06/2006 Promotionsarbeit am *MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie* Golm

Veröffentlichungen

Arrivault S., Senger T. and Krämer U. (2006). The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *Plant J* **46**(5), 861–879. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02746.x

Senger T., Wichard T., Kunze S., Göbel C., Lerchl J., Pohnert G. and Feussner I. (2005). A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem* **280**(9), 7588–7596. doi:10.1074/jbc.M411738200

Senger T. (2002). Klonierung und Charakterisierung einer Lipoxygenase aus *Phaeodactylum tricornutum*. *Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität.*

Senger T. (2000). Partition coefficients of cocaine and cocaine hydrochloride between membranes/octanol and water and influences of these drugs on membrane proteins. *Bachelorarbeit, University of Wales, Swansea.*